

Inês Maria Castelhana Graça Andrade

Análise funcional de uma quitinase da classe III (CgCHI3) e de uma glutathione S-transferase (CgGST), envolvidas na simbiose entre *Casuarina glauca* e *Frankia*.

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica, especialidade Biotecnologia, pela Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Abril, 2014

Análise funcional de uma quitinase da classe III (CgCHI3) e de uma glutathione S-transferase (CgGST), envolvidas na simbiose entre *Casuarina glauca* e *Frankia*.

Copyright Inês Maria Castelhana Graça Andrade.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

A ti, minha querida minha Avó, dedico este trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, sem o apoio dos quais esta etapa teria sido com certeza bem mais complicada. Agradeço toda a ajuda sem a qual eu não teria conseguido sobreviver a estes 4 anos, principalmente o último ano.

À minha irmã e ao meu cunhado, por serem os segundos “pais” da Maria em tantos momentos e ao Gustavo por ser um “irmão” companheiro.

Aos meus sogros agradeço todo o apoio “logístico” com a minha filha.

Às minhas orientadoras e amigas, a Doutora Ana Isabel Ribeiro e a Professora Doutora Alice Pereira, sem as quais este trabalho não teria sido possível. Agradeço terem-se mostrado disponíveis para me receber nos seus laboratórios. Um muito obrigado pela disponibilidade, pela amizade bem como todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos. Não posso deixar de agradecer também ao meu coorientador o Doutor José Ramalho e ainda ao meu grupo de trabalho “Plant Stress Biodiversidade – BIOTROP (IICT) e ao Grupo do Laboratório de Biofísica Molecular da FCT-UNL.

Um obrigado especial às minhas amigas e colegas de trabalho, Ana Fortunato e Paula Santos, por toda a paciência e apoio incondicional nos meus momentos menos positivos. Foram sempre o meu grande apoio. À minha amiga Manuela Gouveia, com a qual iniciei o meu percurso na investigação neste laboratório e pela qual tenho uma enorme estima e admiração.

Não posso esquecer também outros colegas que fizeram parte do meu percurso e que para além da amizade contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho: Paula Alves, Eduardo Leitão, Luís Goulão, Pedro Sousa, Isabel Palos, Elisabete Carapuça, Inês Martins, Patrícia Santos, Márcia Guilherme, Daniela Penas ... e alguns mais que podem ter escapado.

Ao grupo de investigação do Dr. Philippe Normand, laboratório de simbioses actinorrízicas (Unidade de Ecologia microbiana, CNRS, Universidade de Lyon, França) pela forma como fui recebida e pela disponibilidade no desenvolvimento do ensaio da atividade da CgCH13 nos fatores de nodulação da bactéria *Frankia*, imprescindível à conclusão deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, agradeço pelo financiamento da bolsa SFRH/BD/41589/2007, cofinanciada pelo PIDDAC e pelo Fundo Social Europeu, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

E, como os últimos, são também os primeiros, OBRIGADO Maria & Mário por fazerem parte da minha vida.

Resumo

As plantas actinorrízicas constituem elementos chave dos ecossistemas naturais, apresentando elevada capacidade de adaptação a ambientes adversos extremos. A maior parte deste grupo de plantas contém ainda elevados teores de azoto, devido à sua capacidade de estabelecer simbioses ao nível da raiz com bactérias fixadoras de azoto do género *Frankia*. A simbiose é um processo ontogenético que requer uma sequência de eventos altamente coordenados. Um desses mecanismos é a indução de genes relacionados com a defesa, cujo principal papel durante a interação simbiótica continua por elucidar.

Esta tese baseou-se no estudo de duas proteínas de defesa envolvidas na simbiose actinorrízica estabelecida entre *Casuarina glauca* e bactérias fixadoras de azoto do género *Frankia*, designadamente uma quitinase da classe III (CgCHI3) e uma glutathione S-transferase (CgGST). O estudo consistiu na clonagem, sobre-expressão e posterior caracterização bioquímica e biológica, por forma a compreender a sua função durante o processo simbiótico. Neste contexto, foram construídos dois sistemas de sobre-expressão em *Escherichia coli* BL21 (DE3) para a produção das proteínas recombinantes na forma solúvel, funcionalmente ativas e em quantidades adequadas para a realização dos diferentes ensaios. As duas proteínas foram clonadas nos vetores pET-28b e pET-21c, respetivamente.

Apesar de ser produzida na forma de agregados proteicos, a CgCHI3 apresentou atividade para os substratos da endoquitinase, β -1,3 glucanase, β -1,4 glucanase e lizozima, bem como capacidade de inibição de crescimento de bactérias não-simbióticas (*E. coli* BL21 e K12, *Paracoccus denitrificans* e *Bacillus subtilis*). Não demonstrou atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* e *Fusarium oxysporum*, nem afetou o crescimento de bactérias simbióticas (*Frankia* e rizóbio) ou a performance dos fatores de nodulação de *Frankia*. Os resultados sugerem que esta é uma proteína multifuncional provavelmente envolvida no processo de infeção, mais especificamente na lise da parede celular, durante a penetração intracelular, e/ou na formação do canal de infeção ou em qualquer outra modificação das células para acomodar as bactérias simbióticas.

A CgGST recombinante, foi produzida na forma solúvel e também se mostrou

funcionalmente ativa, mostrando atividade para o substrato 1-cloro2,4-dinitrobenzeno (CDNB), indicando que esta proteína poderá estar envolvida em processos de desintoxicação celular e em resposta ao stresse oxidativo.

A tese está dividida em 5 capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral onde se aborda o processo de fixação simbiótica de azoto em plantas actinorrízicas, acompanhado da formação de um novo órgão – o nódulo radicular, bem como o estado da arte do envolvimento de eventos/genes de defesa neste tipo de simbioses, com destaque para as quitinases e glutathione S-transferases. O segundo capítulo descreve os métodos usados na produção e caracterização bioquímica e biológica da enzima CgCHI3 e na caracterização bioquímica da enzima CgGST. No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos, que são discutidos no capítulo quatro. O quinto e último capítulo refere-se às considerações finais.

Abstract

Actinorhizal plants are key elements of natural ecosystems. Besides their high adaptability to extreme harsh environments, most actinorhizal plants have the capacity to obtain high levels of nitrogen due to their ability to establish symbiosis at the root level with nitrogen fixing bacteria of the genus *Frankia*. The symbiosis is an ontogenic process that requires a highly coordinated sequence of events. One of such mechanisms is the induction of defense-related genes, whose main role during the symbiotic interaction remains to be elucidated.

This thesis was based on the study of two defense-related proteins involved in the actinorhizal symbiosis established between *Casuarina glauca* and nitrogen fixing bacteria *Frankia*, namely a class III chitinase (CgCHI3) and a glutathione S-transferase (CgGST). The study consisted in the cloning, overexpression and subsequent biochemical and biological characterization of the proteins, in order to understand their function during the symbiotic process. In this context, two overexpression systems were constructed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) for the production of the recombinant functionally active proteins in the soluble form, and in amounts suitable for performing the various tests. The two proteins were cloned into the vectors pET-28b and pET-21c, respectively. Despite being produced in the form of inclusion bodies, CgCHI3 showed endochitinase, β -1,3 glucanase, β -1,4 glucanase and lysozyme activity, as well as the capacity to inhibit the growth of non-symbiotic bacteria (*E. coli* BL21 and K12, *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*). It displayed no antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* and *Fusarium oxysporum*) and did not affect the growth of symbiotic bacteria (*Frankia* and rhizobium) or the performance of *Frankia* nodulation factors. The results suggest that CgCHI3 is probably a multifunctional protein involved in the infection process, specifically in the lysis of the cell wall during intracellular penetration or the formation of the infection thread or any other modification of the cells in order to accommodate the symbiotic bacteria. The recombinant CgGST was produced in the soluble form and also proved to be functionally active, showing activity for the substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), indicating that this protein may be involved in cellular detoxification processes and in response to oxidative stress.

This thesis is divided into five chapters, the first being a general introduction to symbiotic nitrogen fixation in actinorhizal plants, as well as the state of the art on defense-related events/genes in such symbiosis, particularly chitinases and glutathione S-transferases.

The second chapter is focused on methods used on the production and biochemical and biological characterization of CgCHI3 and biochemical characterization of CgGST. The third chapter presents the results, which are discussed in the fourth chapter. In the fifth chapter the final considerations are presented.

Índice geral

Capítulo I – Introdução Geral	1
I.1 - Fixação biológica de azoto	1
I.2 – Simbioses actinorrízicas	3
I.2.1 – <i>Frankia</i>	3
I.2.2 – Plantas actinorrízicas.....	3
I.2.3 – Simbiose <i>Casuarina glauca</i> - <i>Frankia</i>	7
I.3 – Genes envolvidos na simbiose <i>Casuarina glauca</i> – <i>Frankia</i>	9
I.4 - Quitinases.....	11
I.4.1 - Quitina: estrutura, localização e função.....	11
I.4.2 - Classificação das quitinases.....	12
I.4.3 - Diversidade de funções das quitinases.....	16
I.4.4 - Quitinases de plantas	16
I.5 - Glutathione-S-Transferase	17
I.5.1 - Classificação das GSTs de plantas	17
I.5.2 – Estrutura das GSTs de plantas	18
I.5.3 - Função das GSTs de plantas.....	19
I.5.4 - Evolução das GST de plantas	19
I.6 - Objetivos	20
Capítulo II – Materiais e Métodos	22
II.1 – Materiais	22
II.1.1 – Material vegetal.....	22
II.1.2 – A bactéria <i>Frankia</i>	22
II.1.3 – Plasmídeos	22
II.2 – Métodos	25
II.2.1 – Condições de crescimento de <i>C. glauca</i>	25
II.2.2 – Cultura de <i>Frankia</i>	26

II.2.3 – Nodulação das plantas <i>C. glauca</i>	28
II.2.4 – Extração de ácidos nucleicos.....	28
II.2.5 – Amplificação da região codificante (ORF) dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i>	29
II.2.6 – Clonagem e amplificação dos plasmídeos em <i>Escherichia coli</i> DH5 α	30
II.2.7 – Sub-clonagem de <i>CgChi3</i> -ORF e <i>CgGst</i> -ORF nos vetores de expressão.....	32
II.2.8 – Sobreprodução das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	33
II.2.9 – Expressão das proteínas recombinantes	34
II.2.10 – Purificação das proteínas recombinantes	36
II.2.11 – Análise funcional das proteínas recombinantes.....	40
Capítulo III – Resultados	47
III.1 – Desenho dos oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificação dos genes que codificam as proteínas em estudo	47
III.2 – Amplificação da região codificante dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i>	50
III.3 – Clonagem dos produtos da PCR	51
III.3.1 – Subclonagem de <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i> nos vetores de expressão pET-28b e pET-21c51	51
III.4 – Produção das proteínas recombinantes	54
III.4.1 – Otimização das condições de expressão	54
III.4.2 – Produção em grande escala das proteínas recombinantes	55
III.5 – Purificação das proteínas recombinantes.....	58
III.5.1 – Solubilização de <i>CgCHI3</i> a partir dos corpos de inclusão	58
III.5.2 – Purificação <i>CgCHI3</i> a partir da solubilização dos corpos de inclusão	59
III.5.3 – Purificação da <i>CgGST</i> a partir da fração solúvel.....	60
III.6 – Caracterização das proteínas recombinantes	62
III.6.1 – Propriedades bioquímicas	62
III.6.2 – Sequenciação da região N-terminal da <i>CgCHI3</i> por degradação de Edman	62
III.6.3 – Quantificação das proteínas <i>CgCHI3</i> e <i>CgGST</i>	63
III.6.4 – Análise funcional das proteínas recombinantes.....	64
Capítulo IV - Discussão	70
IV.1 – <i>CgCHI3</i>	70
IV.1.1 – Análise bioinformática	70

IV.1.2 – Caracterização bioquímica e da atividade biológica	74
IV.1.3 – Função no processo simbiótico	78
IV.2 – CgGST	78
IV.2.1 – Análise bioinformática.....	78
IV.2.2 – Caracterização bioquímica	80
IV.2.3 – Função no processo simbiótico	81
Capítulo V - Considerações finais	82
Bibliografia	84
Anexos	101

Índice de figuras

Figura I.1	Sintomas da deficiência de azoto em plantas	1
Figura I.2	Distribuição geográfica mundial de <i>Casuarina glauca</i>	6
Figura I.3	Figura ilustrativa de uma árvore de <i>Casuarina glauca</i>	7
Figura I.4	Representação esquemática das etapas do desenvolvimento do nódulo em <i>Casuarina glauca</i>	8
Figura I.5	Esquema representativo da estrutura de um nódulo actinorrízico	9
Figura I.6	Estrutura primária da quitina e quitosana	12
Figura I.7	Estruturas tridimensionais da ChiA e ChiB de <i>Serratia marcescens</i>	14
Figura I.8	Mecanismo catalítico das quitinases das GH18	15
Figura II.1	Mapa do vetor pJET1.2/blunt e sequência de DNA da região MCS (Multiple cloning site)	23
Figura II.2	Mapas dos vetores de expressão pET-21c e pET-28b	24
Figura II.3	Propagação de plantas <i>C. glauca</i>	26
Figura II.4	Raízes contendo nódulos jovens de <i>C. glauca</i>	28
Figura II.5	Esquema do protocolo usado nos crescimentos microbianos em pequena escala	35
Figura II.6	Esquema do procedimento efetuado para obtenção do extrato proteico solúvel para purificação das proteínas recombinantes CgCHI3 e CgGST produzidas em <i>E. coli</i>	37
Figura II.7	Esquema representativo desde a germinação à observação microscópica de <i>Alnus glutinosa</i> inoculada com a bactéria <i>Frankia</i> e incubada com a enzima CgCHI3 pura	45
Figura III.1	Sequência completa dos cDNAs CgChi3 e CgGst	47
Figura III.2	Mapa de restrição dos genes CgChi3 e CgGst	48
Figura III.3	Sequência da região codificante (ORF) dos genes CgChi3 e CgGst e sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados na amplificação dos mesmos	49
Figura III.4	Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose	50
Figura III.5	Verificação da reação de ligação dos produtos da PCR ao vetor de clonagem pJET1.2 após cPCR, por eletroforese em gel de agarose	51
Figura III.6	Verificação da reação de hidrólise dos plasmídeos recombinantes e dos vetores de expressão pelas endonucleases de restrição Nde I e Sal I, por eletroforese em gel de agarose	52
Figura III.7	Mapa dos vetores de expressão construídos para produção de CgCHI3 e CgGST em <i>E. coli</i>	53
Figura III.8	Análise da sobre-expressão das proteínas recombinantes CgCHI3 e CgGST em células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	54
Figura III.9	Monitorização, por SDS-PAGE (12,5% em acrilamida), da produção em larga escala das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	55

Figura III.10	Avaliação do efeito da temperatura na produção de CgCHI3 em <i>E. Coli</i> BL21(DE3)	56
Figura III.11	Sobre-expressão da CgCHI3 em <i>E. coli</i> nas estirpes C41 (DE3) e C43 (DE3).....	57
Figura III.12	Verificação do processo de solubilização dos corpos de inclusão	58
Figura III.13	Perfil cromatográfico da purificação da CgCHI3 sobre-expressa em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a partir da solubilização dos corpos de inclusão, na coluna de afinidade “HisTrap™ FF Columns”	59
Figura III.14	Perfil cromatográfico da purificação da CgGST sobre-expressa em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), na coluna de afinidade GSTrap HP	61
Figura III.15	Sequência de aminoácidos da CgCHI3 recombinante deduzida a partir da sequência de nucleótidos da proteína híbrida.....	63
Figura III.16	Reta de calibração para a quantificação de proteína total pelo método do BCA	63
Figura III.17	Atividade quitinolítica de CgCHI3 usando CM-Chitin-RVB como substrato	64
Figura III.18	Atividade lisozimática da CgCHI3 usando uma cultura celular de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	65
Figura III.19	Atividade β -1,3-glucanase da CgCHI3 usando CM-Curdlan-RBB como substrato	66
Figura III.20	Atividade β -1,4-glucanase (carboximetil celulase) da CgCHI3 usando carboximetil celulose	66
Figura III.21	Atividade antifúngica da CgCHI3	67
Figura III.22	Placas contendo LB agar, inoculadas com as diferentes estirpes bacterianas e na presença de CgCHI3 a 37 °C.....	68
Figura III.23	Atividade de glutathione-S-transferase da CgGST em 0,1 M de tampão fosfato de potássio	69
Figura IV.1	Análise comparativa da estrutura primária da CgCHI3 com outras espécies de plantas reportadas como pertencentes à classe III das quitinases, família 18 das hidrolases de glicosilo	72
Figura IV.2	Análise comparativa da estrutura primária da CgGST com outras espécies de plantas reportadas como pertencentes à classe tau, família das glutathione S-transferases e superfamília das proteínas citosólicas	79

Índice de tabelas

Tabela I.1	Famílias e géneros das plantas actinorrízicas	4
Tabela I.2	Distribuição das plantas actinorrízicas pelos 5 continentes	5
Tabela I.3	Genes de defesa de <i>Casuarina glauca</i> e sua provável função na simbiose com <i>Frankia</i>	10
Tabela II.1	Composição do meio de Broughton and Dillworth's (BD) modificado	25
Tabela II.2	Composição do meio BAP-PCM para a cultura de <i>Frankia</i>	27
Tabela II.3	Composição da reação para síntese de cDNA	29
Tabela II.4	Otimização das condições de amplificação da ORF dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i>	30
Tabela II.5	Condições de reamplificação da ORF dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i> para subclonagem nos vetores de expressão	30
Tabela II.6	Composição da reação de ligação do pJET aos produtos da PCR.....	31
Tabela II.7	Composição da reação de hidrólise dos vetores de expressão pET-21c e pET-28b e dos vetores de clonagem contendo os genes que codificam as proteínas de interesse	32
Tabela II.8	Composição da reação de ligação dos vetores pET-28b e pET-21c a <i>CgChi3</i> -ORF e <i>CgGst</i> -ORF.....	33
Tabela II.9	Otimização das condições de sobre-expressão das proteínas recombinantes	35
Tabela II.10	Composição dos tampões usados na solubilização da proteína recombinante <i>CgCHI3</i> dos corpos de inclusão	38
Tabela II.11	Composição dos tampões usados na purificação da proteína <i>CgCHI3</i> por cromatografia de afinidade	39
Tabela II.12	Composição do tampão de ligação usado na purificação da proteína <i>CgGST</i>	39
Tabela III.1	Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificação dos cDNA-ORF dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i>	49
Tabela III.2	Condições da PCR otimizadas para amplificação dos genes <i>CgChi3</i> e <i>CgGst</i>	50
Tabela III.3	Condições ótimas de sobre-expressão das proteínas recombinantes <i>CgCHI3</i> e <i>CgGST</i> em células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	54
Tabela III.4	Parâmetros teóricos característicos da <i>CgCHI3</i> e <i>CgGST</i>	62

Símbolos e abreviaturas

A₁₀₀ – Ampicilina 100 mg/ml

Abs – Absorvância

AMV RT- *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*

BCA - Ácido bicinconínico

Bp - Pares de bases de DNA

BSA - Albumina do soro bovino

C-terminal – Região do carboxilo terminal da cadeia polipeptídica

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CM-Chitin-RBV – *Carboxymethyl Chitin Remazol Brilliant Violet*

CM-Curdlan-RBB – *Carboxymethyl Curdlan Remazol Brilliant Blue*

CMC – Carboximetil-celulase

cPCR – PCR de colónias

Da – Dalton

DHARs – Desidroascorbato redutase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Nuclease do DNA

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfatados

OD – Densidade ótica

DR – Desnaturante-renaturante

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

ENOD – Nodulina precoce

EtBr – Brometo de etídio

FBA – Fixação biológica de azoto

gDNA – DNA genómico

GlcN – D-glucosamina

GlcNAc – N-acetil-D glucosamina

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Dissulfureto de glutathione (forma dimérica oxidada da GSH)

GST – Glutathione S-transferase
 IBA – Ácido indol-butírico
 IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
 ISH – Hibridação *in situ*
 K30 – Canamicina
 LB – Meio Luria-Bertani
 LMW - Marcador de baixas massas moleculares - *Low Molecular Weight*
 N-terminal – Região amino terminal da cadeia polipeptídica
 NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
 O/N – Durante a noite
 ORF – *Open Reading Frame*
 PCA – Fosfato de potássio-ácido cítrico
 PCR – Reação em cadeia da polimerase do ADN – *Polymerase Chain Reaction*
 PDA – *Potato Dextrose Agar*
 pDNA – Ácido desoxirribonucleico plasmídico
 pI – Ponto isoelétrico
 PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
 PVDF – Membrana de transferência de fluoreto de polivinilideno
 RNA – Ácido ribonucleico
 Rpm – Rotações por minuto
 RT – *Reverse transcriptase*
 SDS – Dodecil sulfato de sódio
 SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (na presença de SDS)
 TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA
 Taq – *Thermus aquaticus*
 TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
 Tris – Tris-hidroxi-metil-aminometano
 U – Unidades de atividade enzimática
 UV – Ultravioleta
 YME – Extrato de manitol levedura
 ϵ – Coeficiente de extinção molar

Capítulo I – Introdução Geral

I.1 - Fixação biológica de azoto

O crescimento de todos os organismos depende da disponibilidade de nutrientes minerais, sendo o mais importante o azoto, o qual é necessário em grandes quantidades como componente essencial das proteínas (está presente nos aminoácidos) e ácidos nucleicos (bases azotadas), entre outros constituintes celulares. Apesar de ser o principal constituinte da atmosfera terrestre – cerca de 80% na forma gasosa - a sua utilização pela grande maioria dos seres vivos não ocorre de forma direta. Assim, o azoto é frequentemente um fator limitante não só para o crescimento, mas também para a produção de biomassa em todos os ambientes onde haja um clima adequado e disponibilidade de água para suportar vida (Franco & Döbereiner, 1994). No caso das plantas, a falta ou insuficiência deste nutriente debilita e atrasa o desenvolvimento podendo resultar em necrose gradual das folhas mais velhas e redução do crescimento, sendo que em detrimento das reservas da parte aérea, a planta promove um alongamento do sistema radicular, na tentativa de alcançar nutrientes (Figura I.1). Em casos mais severos, ocorre a redução do tamanho dos folíolos e as nervuras principais apresentam uma coloração púrpura, contrastando com o verde-pálido das folhas. Os botões florais amarelecem e caem.

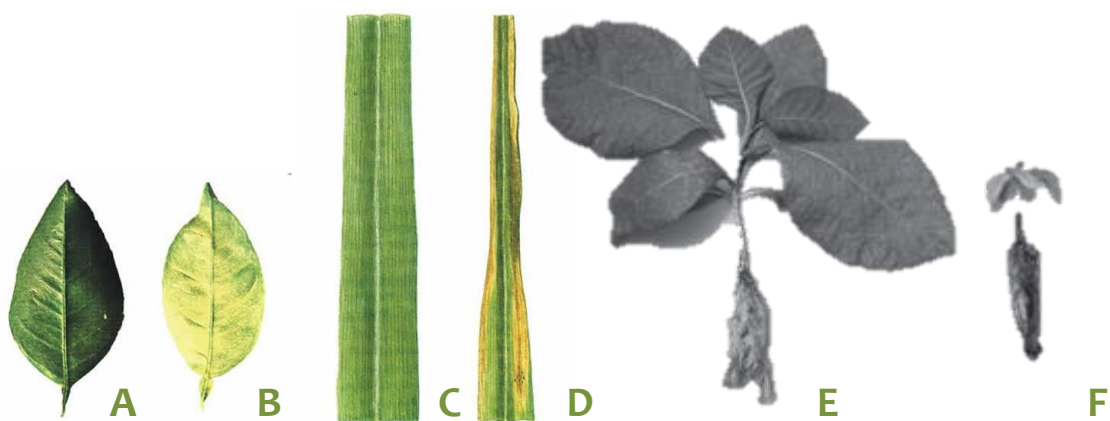


Figura I.1 - Sintomas da deficiência de azoto em plantas. Plantas em condições normais de nutrição azotada (A, C e E) e em privação de azoto (B, D e F). http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_nitrogenio.aspx.

A grande maioria das plantas absorve o azoto disponível no solo sob a forma de amoníaco e nitratos através das raízes. A indisponibilidade de azoto no solo e a dependência deste elemento para o crescimento vegetal levou à criação de indústrias de fertilizantes azotados em todo o mundo (Dobermann, 2007; Westhoff, 2009). Contudo, os efeitos adversos da aplicação de fertilizantes químicos são sobejamente conhecidos. Sendo que apenas cerca de 50% do fertilizante aplicado é utilizado pelas plantas, o seu uso contribui para a contaminação dos solos e águas subterrâneas, conduzindo a graves riscos para a saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola e ambiental. Além disso, a produção de fertilizantes azotados requer seis vezes mais energia do que a necessária para a produção de fertilizantes fosfatados ou potássicos (Da Silva et al., 1978).

Alguns procariotas (bactérias diazotróficas) possuem a capacidade de utilizar diretamente o azoto atmosférico (N_2) através de um processo conhecido como fixação biológica de azoto, numa reação catalisada pela enzima nitrogenase - um complexo enzimático que catalisa a conversão de N_2 em amónia (NH_3) (Lam et al., 1996). Nalguns casos, estes organismos estabelecem associações simbióticas com plantas superiores. Neste tipo de associação, as plantas hospedeiras recebem azoto do parceiro simbiótico que, em troca, recebe carbono reduzido e, possivelmente, todos os outros nutrientes que necessita (Diouf et al., 2003). No caso das bactérias diazotróficas que estabelecem simbioses de raiz com plantas dicotiledóneas, a fixação de azoto é realizada por bactérias do género *Rhizobium* (organismos unicelulares gram-negativos) e *Frankia* (organismos filamentosos gram-positivos), envolvendo a formação de um órgão especializado, o nódulo radicular, onde o azoto atmosférico é reduzido a amónia (Schultze & Kondorosi, 1998; Oldroyd & Downie, 2008; Desbrosses & Stougaard, 2011). No primeiro caso, a simbiose é estabelecida quase exclusivamente com plantas da família Leguminosae (leguminosas), com apenas uma exceção, a espécie *Parasponia andersonii*, da família Ulmaceae. No segundo caso, a capacidade simbiótica estende-se a oito famílias (Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae e Rosaceae), designadas plantas actinorrízicas.

1.2 – Simbioses actinorrízicas

1.2.1 – *Frankia*

O género *Frankia* pertence ao grupo dos actinomicetos do solo da família Frankiaceae (Benson & Silvester, 1993). O primeiro isolamento bem-sucedido de *Frankia* foi efetuado a partir de nódulos de *Comptonia peregrina* (Callaham et al., 1978). Atualmente, conhecem-se mais de 200 estirpes de *Frankia* (Normand et al., 1996; Benson & Clawson, 2000; Hahn, 2008). Em cultura pura, estas bactérias formam hifas vegetativas que crescem lentamente (Benson et al., 2011). Para além das hifas, são ainda conhecidos, o esporângio multilocular, estrutura que garante a sobrevivência e disseminação da bactéria no solo (van Loon, 1999; Huss-Danell et al., 1997) e as vesículas formadas nas hifas que constituem o local de fixação de azoto. As vesículas são normalmente esféricas quando em cultura pura, assumindo muitas vezes diferentes formas (esférica, elíptica, claviforme, septada ou não septada) no estado simbiótico (Wall, 2000). Estas estruturas contêm um invólucro lipídico que protege a inativação da enzima nitrogenase pelo oxigénio (Harriott et al., 1991; Berry et al., 1993; Dobritsa et al., 2001). No entanto as dificuldades taxonómicas persistem e até à data não existe uma classificação dos diferentes organismos isolados até ao nível da espécie (<http://web.uconn.edu/mcbstaff/benson/Frankia/FrankiaTaxonomy.htm>).

A taxa de crescimento lento, o elevado teor de G+C do DNA e a ausência de um sistema de transformação genética têm sido fatores limitantes à investigação em actinobactérias do género *Frankia*, particularmente no que diz respeito à simbiose com plantas superiores (Bent, 1996; Sprent & Parsons 2000). Até à data, estão disponíveis as sequências de 11 genomas de *Frankia* (Tisa et al., 2013), sem contudo terem sido identificados os genes que conferem a capacidade simbiótica (Normand et al., 2007).

1.2.2 – Plantas actinorrízicas

As plantas actinorrízicas representam um grupo diversificado de cerca de 220 espécies pertencentes a oito famílias distribuídas por 25 géneros e três ordens, Fagales (Betulaceae, Casuarinaceae e Myricaceae), Rosales (Rosaceae, Eleagnaceae e Rhamnaceae) e Cucurbitales (Datiscaceae e Coriariaceae) (Tabela I.1) (Wall, 2000; Pawlowski, 2009; Franche

& Bogusz, 2011). Com exceção de uma única espécie, *Datisca glomerata* (C. Presl) Baill, que é uma herbácea, as plantas actinorrízicas incluem arbustos ou árvores (Benson & Silvester 1993) e estão distribuídas em todo o mundo (Tabela I.2), desde as regiões frias (exceto Antártica), como por exemplo o amieiro (*Alnus glutinosa*), até às latitudes mais quentes, como por exemplo a casuarina (*Casuarina* spp.). A sua ocorrência pode ser observada em zonas de grande altitude, regiões secas ou alagadas, solos aluviais, dunas costeiras, solos litólicos, solos que sofreram erosão (Klemmedson, 1979) e ainda sob uma variedade de stresses ambientais tais como salinidade elevada, solos contaminados com metais pesados e valores de pH extremos (Dawson, 1990). Por serem maioritariamente lenhosas e resilientes a ambientes extremos, as plantas actinorrízicas têm um grande impacto ecológico, sendo amplamente usadas na recuperação e estabilização de ecossistemas degradados, como é o caso da revegetação de diferentes paisagens, recuperação de solos marginais ou prevenção da desertificação (Diem & Dommergues 1990; Dawson, 2008). Para além da importância ecológica, estas plantas têm elevado valor económico, sendo muito usadas para a produção de madeira, lenha e derivados.

Tabela I.1 – Famílias e géneros das plantas actinorrízicas.

Família	Género
Betulaceae	<i>Alnus</i>
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Ceuthostoma</i> , <i>Gymnostoma</i>
Coriariaceae	<i>Coriaria</i>
Datisceae	<i>Datisca</i>
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i> , <i>Hippophae</i> , <i>Shepherdia</i>
Myricaceae	<i>Comptonia</i> , <i>Myrica</i>
Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i> , <i>Colletia</i> , <i>Discaria</i> , <i>Kentrothammus</i> , <i>Retanilla</i> , <i>Talguenea</i> , <i>Trevoa</i>
Rosaceae	<i>Cercocarpus</i> , <i>Chamaebatia</i> , <i>Cowaniana</i> , <i>Dryas</i> , <i>Purschia</i>

Tabela 1.2 – Distribuição das plantas actinorrízicas pelos 5 continentes.

Continente	Género
Eurásia	<i>Alnus</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Datisca</i> , <i>Dryas</i> , <i>Elaeagnus</i> , <i>Hippophaë</i> , <i>Myrica</i> , <i>Casuarina</i> e <i>Gymnostoma</i>
América	<i>Alnus</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Cercocarpus</i> , <i>Chamaebatia</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Datisca</i> , <i>Dryas</i> , <i>Elaeagnus</i> , <i>Cowaniana</i> , <i>Purschia</i> , <i>Shepherdia</i> , <i>Casuarina</i> e <i>Elaeagnus spp</i>
América do sul	<i>Alnus</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Discaria</i> , <i>Colletia</i> , <i>Kentthrothammus</i> , <i>Retanilla</i> , <i>Myrica</i> , <i>Talguenea</i> , <i>Trevoa</i> , <i>Casuarina</i> e <i>Elaeagnus</i>
África	<i>Myrica</i> , <i>Casuarina</i> e <i>Elaeagnus</i>
Oceania	<i>Allocasuarina</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Ceuthostoma</i> , <i>Gymnostoma</i> , <i>Myrica</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Discaria</i> , <i>Gymnostoma</i> , <i>Alnus</i> , <i>Elaeagnus</i> e <i>Purschia</i>

1.2.2.1 – *Casuarina glauca*

Casuarina glauca Sieb. Ex Spreng., comumente designada “swamp she-oak”, “swamp oak” ou “river oak” (Burke, 2005) é uma espécie costeira pertencente à família *Casuarinaceae*, ordem *Fagales*. Nativa da costa Este da Austrália (National Research Council 1984), pode ser encontrada nas zonas tropicais e subtropicais da América (EUA, México, Bolívia, Porto Rico, Bahamas e Flórida), África (Egito, Quênia, África do Sul, Malawi e Maurícias), Ásia (Irão, Índia, Indonésia, Israel e Malásia) e Nova Zelândia (Figura 1.2) (Zhong & Zhang 2003; He & Critchley 2008). Cresce naturalmente em planícies estuarinas, inundadas com água salgada das marés e em dunas à beira-mar, ocorrendo a diferentes altitudes (desde o nível do mar até aos 900 m). Embora a maioria da população natural se encontre em solos ácidos, esta espécie cresce bem em solos argilosos e alcalinos das áreas semiáridas quentes da Austrália Central (NAS, 1983).

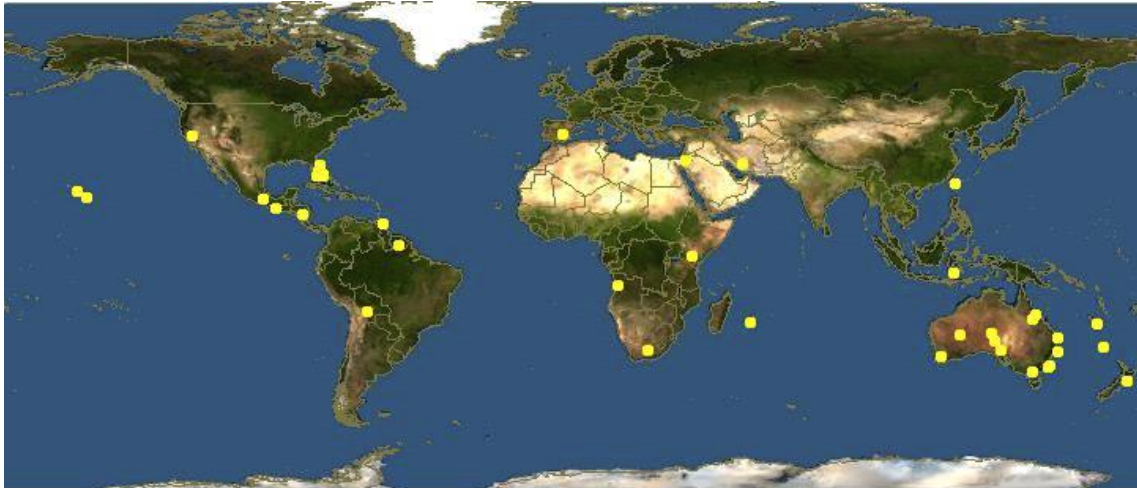


Figura I.2 – Distribuição geográfica mundial de *Casuarina glauca* (© Barcode of Life Data Systems).

Caracteriza-se por ser uma árvore de tamanho médio (8-20 m de altura), podendo no entanto atingir os 30 m (Figura I.3-a), com um sistema radicular lateral bem desenvolvido, útil em locais sujeitos à erosão (Doran & Turnbull, 1997; Boland *et al.*, 2006). A folhagem perene é composta por galhos delgados, designados ramúsculos (Figura I.3-e), que vão do verde-claro ao verde-escuro e de onde saem folhas modificadas. As folhas apresentam-se como pequenas escamas lanceoladas (seta da Figura I.3-e), com cerca de 1 mm de comprimento, o que lhes permite reduzir a evapotranspiração e contribuir assim para a sua adaptação a climas áridos e semiáridos. As flores são pequenas inflorescências (Figura I.3-c) e o fruto é uma estrutura oval lenhosa, superficialmente semelhante a um cone composto de inúmeros carpelos, cada um contendo uma única semente com uma pequena asa (Figura I.3-b) (Huxley, 1992).



Figura 1.3 – Figura ilustrativa de uma árvore de *Casuarina glauca* (a): fruto (b), flor (c), caule (d), ramúsculo com folhas modificadas (e).

Tal como a maioria das plantas actinorrízicas, esta espécie é de grande importância económica e ecológica. Possui múltiplos usos, sendo os principais a produção de lenha e carvão vegetal e a construção (estacas e postes) (Elfers, 1988; Little, 1989). É amplamente usada como cortina quebra-vento (Doran & Turnbull, 1997), bem como para fertilização e reabilitação de solos. O uso de *C. glauca* como modelo de investigação de simbioses actinorrízicas, deve-se à disponibilidade de sistemas de transformação genética (Svistoonoff *et al.*, 2010), bem como ao tamanho relativamente pequeno do genoma (Zhong *et al.*, 2013) e aos inúmeros estudos sobre a biologia do processo simbiótico (He & Critchley, 2008; Franche & Bogusz, 2012; Pawlowski & Demchenko, 2012).

1.2.3 – Simbiose *Casuarina glauca*-*Frankia*

1.2.3.1 – Processo de infeção

O processo de infeção de raízes de *C. glauca* por *Frankia* contempla quatro estágios principais (Figura 1.4): (A) a fase pré-simbiótica, que envolve a perceção e reconhecimento de moléculas sinal específicas e de natureza ainda desconhecida, resultando numa atração química entre as hifas da actinobactéria pelos pêlos radiculares da planta, (B) encaracolamento e aprisionamento da bactéria nos pêlos radiculares, seguido de hidrólise da parede celular e formação do tubo de infeção (Callaham & Torrey 1977; Harrison *et*

al.,1995); (C) formação e infecção do pré-nódulo, resultante da divisão das células corticais da raiz (Tisa & Ensign 1987; Bittner & Beynon 2001, Passardi *et al* 2004); (D) concomitantemente ao desenvolvimento do pré-nódulo, ocorre atividade mitótica nas células do periciclo dando origem ao primórdio do nódulo, a partir do qual se desenvolve o novo órgão – o nódulo actinorrízico (E) (Pless & Lennarz, 1977; Harrison *et al.*, 1995; Passardi *et al.*, 2004).

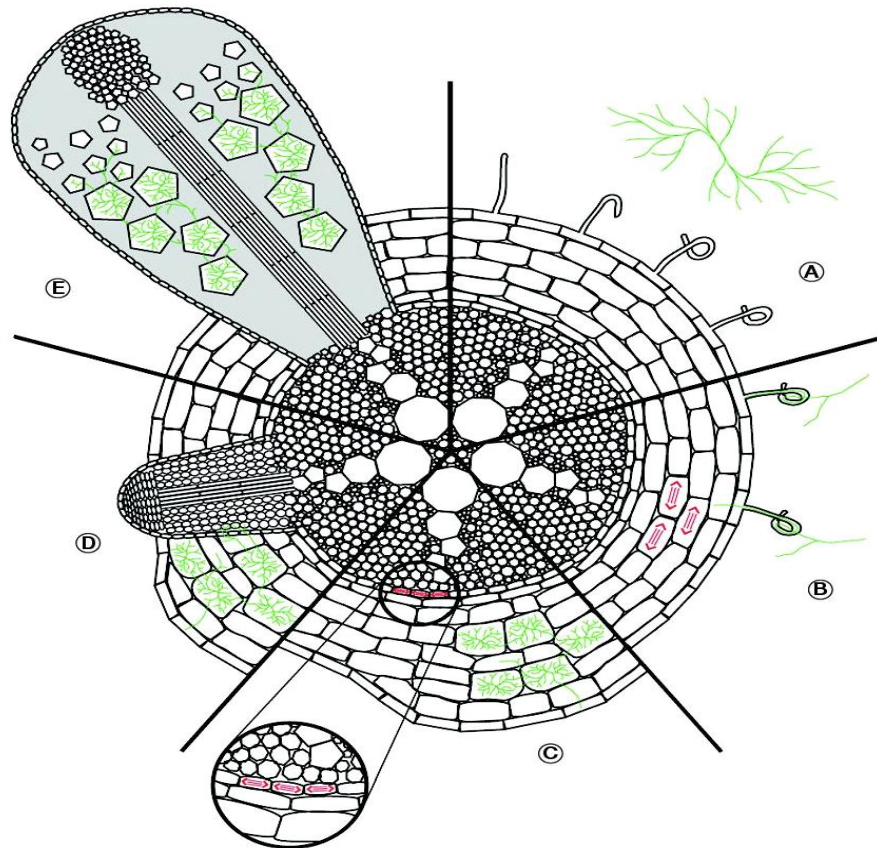


Figura 1.4 – Representação esquemática das etapas do desenvolvimento de um nódulo de *Casuarina glauca*. A troca de sinais entre a planta e a bactéria *Frankia* conduz à adesão da bactéria ao pelo radicular (A). A bactéria penetra na raiz deformada provocando divisões celulares do córtex (B) dando origem ao pré-nódulo (C). Concomitantemente, ocorrem divisões celulares no periciclo dando lugar ao primórdio do nódulo. As hifas de *Frankia* invadem o córtex do primórdio do nódulo (D) a partir do qual é formado o nódulo maduro (E). (Adaptado de Péret *et al.*, 2007).

1.2.3.2 – Estrutura e funcionamento do nódulo

O nódulo actinorrízico de *C. glauca* é um órgão coraloide composto de lóbulos múltiplos, cada um representando uma raiz lateral modificada (Figura 1.5-a) com um feixe vascular central rodeado por tecido cortical, contendo células infetadas e não infetadas, por sua vez

circundado pelo parênquima cortical. Os nódulos têm início no periciclo e são indeterminados, devido à presença de um meristema apical com células em contínua diferenciação (Silvester & Harris, 1990). Cada lóbulo é constituído por quatro zonas (Figura 1.5-b) (Ribeiro *et al.*, 1995): a zona meristemática ou zona 1 que corresponde ao meristema apical, contendo células indiferenciadas não infectadas; a zona de infecção ou zona 2, adjacente à zona 1, onde algumas células corticais provenientes do meristema são infectadas pela bactéria; a zona de fixação ou zona 3, com dois tipos de células: células maduras infectadas, onde ocorre a fixação de azoto, e células não infectadas. Por fim distingue-se uma zona de senescência ou zona 4, onde os citoplasmas das células infectadas dos nódulos e do endossimbionte entram em senescência.

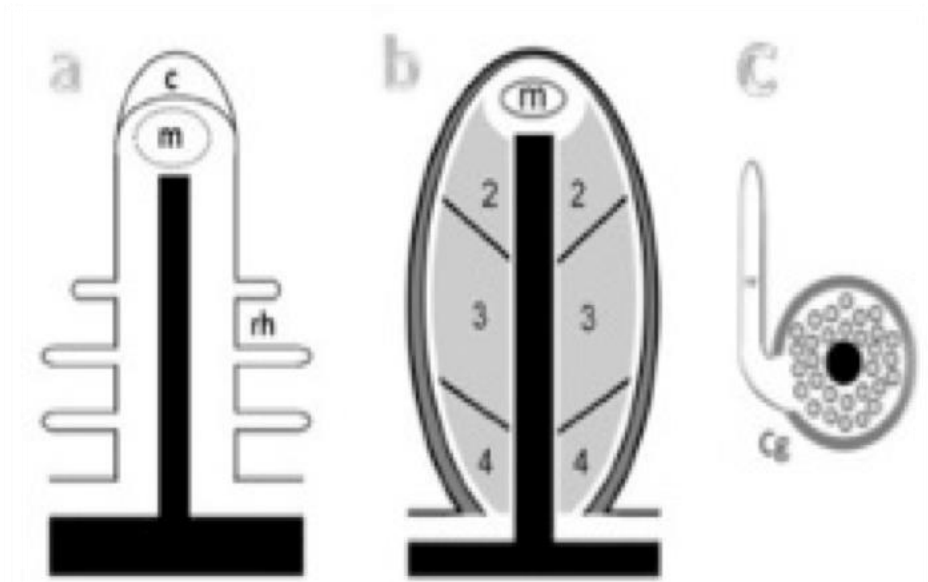


Figura 1.5 – Esquema representativo da estrutura de um nódulo actinorrízico onde se distinguem as quatro zonas características do nódulo. **a)** Esquema de uma raiz não infectada. A preto está identificado o sistema vascular, (c) coifa, (rh) raiz, (m) meristema. **b)** Lóbulo do nódulo. (m) meristema apical, a cinza claro está identificado o córtex que pode ser dividido em três zonas: (2) zona de infecção; (3) zona de fixação; (4) zona de senescência. A cinza-escuro está identificada a periderme, que rodeia o lóbulo do nódulo. **c)** Seção transversal do lóbulo do nódulo actinorrízico. (Adaptado de Pawloswki, 2012).

1.3 – Genes envolvidos na simbiose *Casuarina glauca* – *Frankia*

O processo de nodulação envolve a expressão de um conjunto de genes específicos da bactéria e da planta. No caso da bactéria destacam-se os genes envolvidos no processo de infecção e os genes de fixação de N_2 (Normand *et al.*, 2007; Santos & Tavares, 2011; Tisa *et al.*,

2013). No caso da planta, os genes simbióticos, designados nodulinas, agrupam-se a dois níveis: i) nodulinas precoces, expressas antes do início da fixação de azoto (zonas 1 e 2) (Figura 1.6) e envolvidas no processo de sinalização, reconhecimento da bactéria, infecção e formação do nódulo; e ii) nodulinas tardias, expressas após o início da fixação de azoto (zonas 3 e 4) e envolvidas em processos metabólicos e de senescência (Ribeiro *et al.*, 1995). Entre o conjunto de genes simbióticos da planta, encontram-se os genes relacionados com processos de defesa (Ribeiro *et al.*, 2011). Embora muito permaneça por esclarecer sobre o papel destes genes durante as simbioses em nódulos radiculares, diversos estudos sugerem que a sua ativação poderá estar envolvida nos seguintes processos: (i) controlo da infecção pelo microssimbionte, (ii) controlo do número de nódulos, (iii) proteção contra microrganismos patogénicos externos e (iv) sinalização e desenvolvimento (Gamas *et al.*, 1998; Salzer *et al.*, 2000; Kim & An 2002; Fortunato *et al.*, 2007; Samac & Graham 2007; Tavares *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2008, 2010).

No caso específico de *C. glauca* destacam-se cinco genes: *CgChi1*, *CgChi3*, *CgGst*, *CgHin1* e *CgPox4*, cujas funções putativas estão resumidas na Tabela 1.3 (Fortunato *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

Tabela 1.3 - Genes de defesa de *Casuarina glauca* e sua provável função na simbiose com *Frankia*.

Gene	Proteína	Função nos Nódulos	Referências
CgPox4	Peroxidase classe IV	Desenvolvimento	Santos <i>et al.</i> , 2010
CgGst	Glutathione S-transferase	Proteção	Santos <i>et al.</i> , 2010
CgChi1	Quitinase classe I	Proteção	Santos <i>et al.</i> , 2010
CgChi3	Quitinase classe III	Desenvolvimento	Fortunato <i>et al.</i> , 2007
CgHin1	<i>Hairpin-inducible protein</i>	Senescência ou sinalização do microssimbionte	Santos <i>et al.</i> , 2010

I.4 - Quitinases

Na natureza existe uma grande diversidade de oligossacáridos e polissacáridos, desempenhando os mais diversos papéis que vão desde reserva de energia até à sinalização. Da mesma forma, há também uma grande diversidade de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas, pertencentes à superfamília das hidrolases de glicosilo, e que atuam tanto sobre a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos como entre misturas de carboidratos e demais biomoléculas. Esta superfamília é composta por 81 famílias de enzimas que hidrolisam os mais variados substratos (Henrissat, 1991). As quitinases (EC 3.2.1.14) catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica β -1,4 da quitina, um homopolímero constituído por resíduos de β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina com tamanhos que variam desde os 20 aos 90 kDa (Bhattacharya *et al.*, 2007).

I.4.1 - Quitina: estrutura, localização e função

Tal como acima referido, a quitina é um polímero linear de cadeia longa composto por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), um derivado da glucose, ligados entre si por ligações do tipo β -1,4 (Figura I.6-a), insolúvel em água e o segundo polissacárido natural mais abundante do planeta depois da celulose (Shahidi & Abozaytoun, 2005). Caracteriza-se pela sua cor branca, dureza, inelasticidade, contribuindo em grande parte para a poluição nas zonas costeiras (Zikakis, 1984). A quitosana é o produto resultante da desacetilação da quitina, formado por resíduos de GlcNAc e D-glucosamina (GlcN) (Figura I.6-b). Ao contrário da quitina é solúvel em soluções ácidas diluídas.

Na natureza, a quitina apresenta três formas cristalinas polimórficas diferentes, denominadas α -, β - e γ -quitina. Segundo Blackwell & Rudall (Rudall 1963; Rudall 1967), a α -quitina forma fortes ligações de hidrogénio intra- e intermoleculares, a β -quitina tem fracas ligações intramoleculares de hidrogénio e a γ -quitina estabelece fracas ligações intermoleculares de hidrogénio. A primeira pode ser encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes, a segunda em estruturas flexíveis embora também resistentes, sendo o principal componente dos gládios ou plumas de cefalópodes, e a terceira integra uma cutícula espessa que reveste zonas do estômago (Abram & Higuera, 2004). A α -quitina é a forma mais abundante e é também considerada a mais estável, visto que a conversão das duas últimas formas na primeira é irreversível (Roberts,

1992). Para além de ser o principal componente do exosqueleto de artrópodes e nemátodos, a quitina é também o principal componente da parede celular de bactérias, algas e fungos superiores, tais como *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* e *Deuteromycetes*. Até 60% da parede celular destes organismos pode ser constituída por quitina (Bhattachrya et al., 2007).

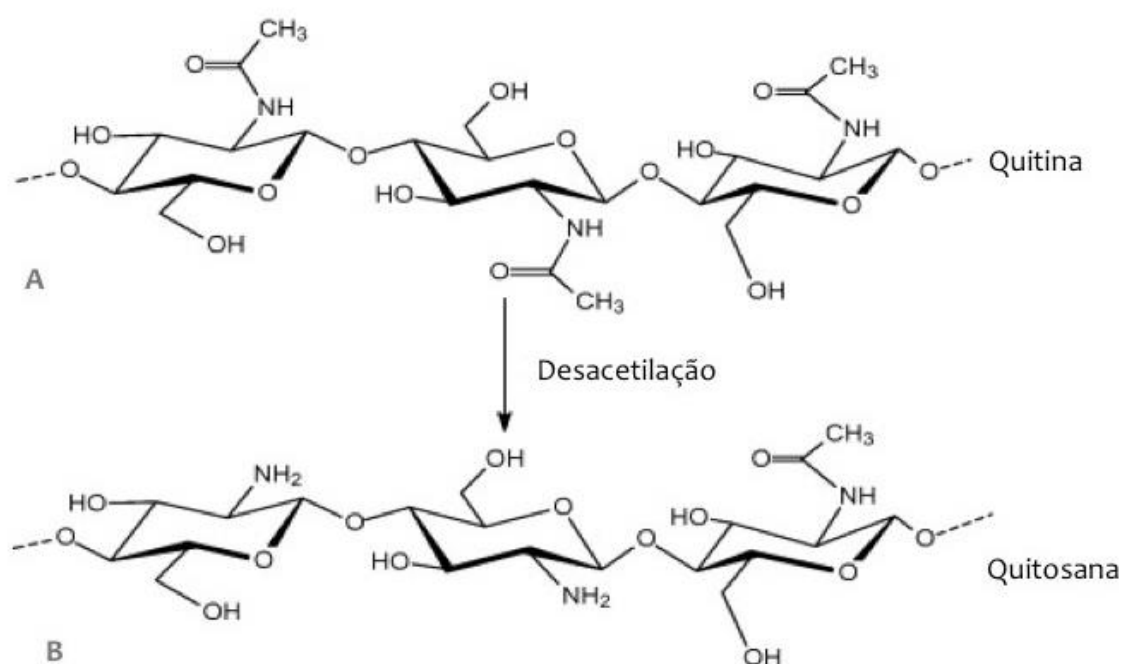


Figura I.6 – Estrutura primária da quitina (A) e quitosana (B) (Adaptado de Tran et al., 2011).

I.4.2 - Classificação das quitinases

Existem classificações diferentes para as quitinases de acordo com a atividade enzimática de hidrólise da quitina. Sahai & Manocha (1993) dividiram-nas em dois grandes grupos: as endoquitinases (EC 3.2.1.14) e as exoquitinases. As primeiras clivam aleatoriamente em sítios internos da quitina dando origem a multímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de baixa massa molecular, como a quitotetrose, quitotriose e diacetilquitobiose (Sahai & Manocha, 1993). As segundas podem ser divididas em dois subgrupos: as quitobiosidases (EC 3.2.1.29) (Harman et al., 1993), que catalisam a libertação de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora da quitina, e as β-(1,4) N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30) que clivam os oligómeros libertados por endoquitinases e quitobiosidases dando origem a monómeros de GlcNAc (Sahai &

Manocha, 1993). A quitosanase (EC 3.2.1.132) converte a quitosana em resíduos de glucosamina (Dahiya *et al.*, 2006).

Baseado na similaridade da sequência de aminoácidos de quitinases de vários organismos, propuseram-se sete classes (classes I-VII), distribuídas em duas famílias, que incluem as famílias 18 e 19 de hidrolases de glicosilo (Henrissat & Bairoch, 1993; Neuhaus *et al.*, 1996). As famílias 18 e 19 incluem enzimas de organismos que vão desde as plantas, às bactérias, fungos, mamíferos e vírus. A subclassificação das quitinases também se baseia na homologia da sequência da região N-terminal, no ponto isoelétrico e na localização da enzima, do péptido sinal e dos indutores de resistência bióticos e abióticos. As quitinases da classe I têm sido encontradas em plantas, enquanto as enzimas da classe II são encontradas em plantas, fungos e bactérias. As quitinases da classe III cuja sequência de aminoácidos é bastante diferente da das classes I ou II, encontram-se descritas em plantas e bactérias. As quitinases da classe IV, apresentam semelhanças com as da classe I, incluindo propriedades imunológicas, sendo no entanto significativamente menores (Patil *et al.*, 2000).

Esta classificação abrange a estrutura e o mecanismo catalítico das quitinases, já que a conservação da sequência se reflete nas estruturas tridimensionais e nos resíduos catalíticos. As quitinases da família 18 possuem um domínio catalítico em barril α/β , formado por oito hélices α e oito folhas β e domínios não catalíticos de ligação à quitina. Embora estas enzimas sejam frequentemente multimodulares, os domínios catalíticos são, como mencionado anteriormente, barris α/β (Terwisscha *et al.*, 1994; Perrakis *et al.*, 1994). Enquanto estão disponíveis várias estruturas para quitinases bi-modulares (Perrakis *et al.*, 1994; van Aalten *et al.*, 1995) (Figura 1.7), pouca informação está descrita no que respeita à estrutura das enzimas multimodulares que é muitas vezes limitada ao domínio catalítico isolado.

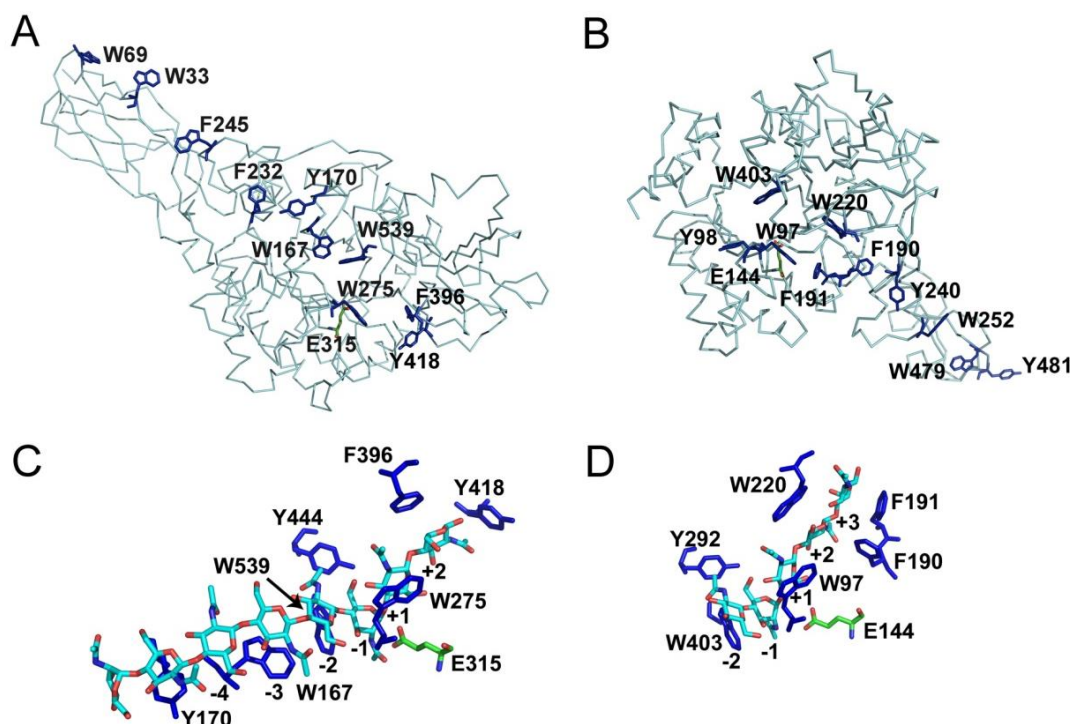


Figura 1.7 – Estruturas tridimensionais da ChiA (esquerda) e ChiB (direita) de *Serratia marcescens*. A e B representam o esqueleto de Ca de cada uma das proteínas, com o domínio não catalítico de ligação ao substrato no canto superior esquerdo em A ou inferior direito em B. As cadeias laterais aromáticas com possível envolvimento na ligação de polissacáridos estão representadas a azul e a cadeia lateral do glutamato ácido/básico aparece a verde. C mostra a estrutura do complexo ChiA-quitoctâmero. D representa a estrutura de ChiB complexada a um quitopentâmero (Zakariassen et al., 2009).

Os resíduos catalíticos destas enzimas foram pela primeira vez identificados para a quitinase A1 de *Bacillus circulans* por Watanabe et al (1993). Por aplicação de técnicas de mutagénese dirigida, os autores provaram que o glutamato 204, um resíduo altamente conservado, atuava como dador de protão na catálise. A reação de catálise retém a configuração anomérica β do substrato, envolvendo um segundo grupo dador, não identificado até à data na proximidade do primeiro (4-5 Å). O mecanismo de “retaining cleavage” foi estudado na hevamina, uma quitinase da árvore-da-borracha (Terwisscha van Scheltinga et al., 1995; Brameld et al., 1998; Fukamizo, 2000; Bokma et al., 2002). Nesta proteína, o oxigénio do grupo carbonilo do substrato atua como um nucleófilo, com a ajuda de um carboxilato (Asp) que atua para desprotonar o azoto *N*-acetamido durante a formação de um ião oxazolínio. Um segundo resíduo (um glutamato no caso da família GH18, mas que poderá também ser um Asp noutras famílias que utilizam este mecanismo) atua como ácido/base para protonar o oxigénio glicosídico para auxiliar na saída da

aglicona, e para desprotonar a molécula de água nucleofílica durante a hidrólise do oxazolínio intermediário. Na família GH18, os dois carboxilatos catalíticos são encontrados no motivo D-X-E (Henrissat & Bairoch, 1993; Sasaki *et al.*, 2003). O motivo D-X-E (Asp 142-Glu 144 na Figura I.8) é parte de um motivo D-X-X-D-X-D-X-E, que inclui mais dois aspartatos para além do Asp 140, conhecido por ser essencial para a atividade catalítica. Existem vários outros resíduos conservados no centro catalítico que desempenham papéis importantes durante a catálise, relacionados com a distorção do resíduo de açúcar -1, a ativação do grupo acetamido e aumento do pKa do ácido catalítico (Synstad *et al.*, 2004). A O₆ do açúcar -1 interage com a cadeia lateral de um outro resíduo de aspartato semiconservado (Asp 215). Em enzimas com um valor ótimo de pH ácido este resíduo é uma asparagina.

Já as quitinases da família 19 possuem domínios ricos em hélices α e a reação catalítica produz alteração da conformação anomérica do substrato envolvendo uma única substituição nucleofílica pela molécula de água. São dois os resíduos catalíticos com grupos carboxílicos, um protona o oxigénio da ligação glicosídica e o outro ativa a molécula de água (Henrissat & Bairoch, 1993).

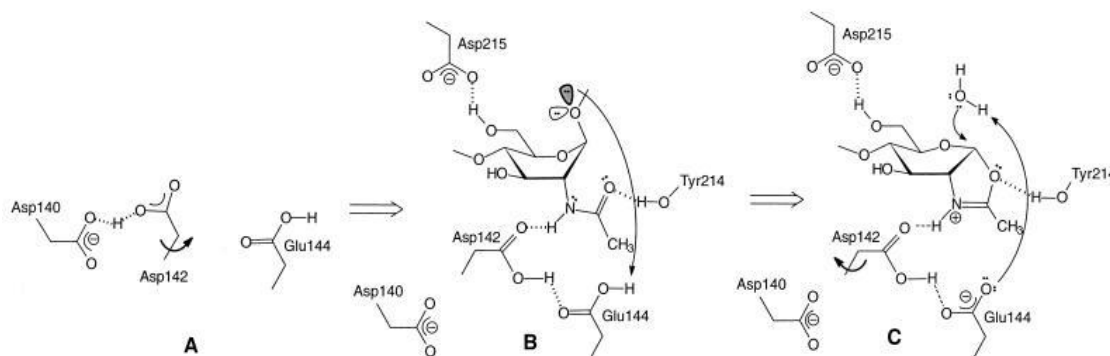


Figura I.8 - Mecanismo catalítico das quitinases da família 18. A imagem mostra o mecanismo proposto para a ChiB de *Serratia marcescens*. O painel C mostra o ião intermediário oxazolínio que está a ser hidrolisado pela entrada de uma molécula de água (van Aalten *et al.*, 2001).

As plantas possuem quitinases de diferentes classes, as quais podem ser distinguidas pela estrutura primária da proteína, especificidade do substrato, mecanismo catalítico e pela sensibilidade aos inibidores (Kasprzewska, 2003). Verificou-se que individualmente, todas as classes de quitinases exibem diferentes especificidades para o substrato e mecanismos reacionais. Por exemplo, no caso da quitinase da classe III do tabaco, verifica-se um nível considerável de atividade de lisozima, bem como atividade quitinolítica,

enquanto as da classe VI apenas apresentam atividade de quitinase (Brunner *et al.*, 1998). As quitinases das classes I e II utilizam um mecanismo de inversão, com a finalidade de hidrolisar a ligação β -glicosídica enquanto a classe III leva a cabo um mecanismo de retenção (Iseli *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2003). Uma funcionalidade de algumas quitinases é o seu domínio de ligação à quitina na extremidade N-terminal da cadeia proteica (Suarez *et al.*, 2001), um domínio caracterizado por um elevado número de resíduos de cisteína que mantêm a conformação da proteína, conservados nas quitinases das classes I e IV.

1.4.3 - Diversidade de funções das quitinases

As quitinases estão presentes em todos os reinos e dependendo do organismo, têm funções diferentes. Por exemplo, as quitinases bacterianas estão envolvidas em processos nutricionais, utilizando quitina para a transferência de carbono e azoto (Fukamizo, 2000). Em leveduras e outros fungos, estão envolvidas em processos de reestruturação da parede celular e divisão celular (Kuranda & Robbins, 1991). Embora a quitina não esteja presente em vírus, mamíferos e plantas, foi encontrada atividade quitinolítica nestes organismos. Uma vez que muitas quitinases são induzidas em resposta à infeção patogénica, pensa-se que estão principalmente envolvidas na defesa contra fungos que contêm quitina na sua parede celular. A atividade lisozimática, que em alguns casos é observada, juntamente com atividade de quitinase, tem sido interpretada como um mecanismo de defesa da planta contra possíveis ataques bacterianos.

1.4.4 - Quitinases de plantas

A abundância de quitinases em plantas é surpreendente tendo em conta o fato das plantas não produzirem quitina. As quitinases foram localizadas em todos os órgãos e tecidos vegetais, tanto no apoplasto como no vacúolo, com diferentes estruturas moleculares e especificidades de substrato (revisto por Kasprzewska, 2003). O envolvimento de quitinases como um mecanismo de defesa ativa ou passiva contra agentes patogénicos tem sido relatado e comprovado experimentalmente. Em geral, a indução rápida e a acumulação de quitinases correlaciona-se com a resistência ao ataque de agentes patogénicos (Samac & Shah, 1991; Meier *et al.*, 1993; Gerhardt *et al.*, 1997). No entanto, as quitinases também podem estar envolvidas em processos de desenvolvimento vegetal,

como o alongamento celular (Zhong *et al.*, 2002) e a embriogénese (Fukamizo, 2000), tolerância ao frio, atuando como proteínas anticongelantes (Yeh *et al.*, 2000; de Los Reyes *et al.*, 2001; Yu & Griffith, 2001) e armazenamento (Peumans *et al.*, 2002). No caso das simbioses com bactérias fixadoras de azoto, pensa-se que as quitinases estejam implicadas no mecanismo de autorregulação, controlando o número de nódulos, bem como na formação dos nódulos (Vassé *et al.*, 1993; Staehelin *et al.*, 1995; Goormachtig *et al.*, 1998; Kim & An, 2002; Fortunato *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011). Além disso, são apontadas como parte integrante do sistema de proteção dos nódulos contra agentes patogénicos (Staehelin *et al.*, 2000; Salzer *et al.*, 2000, 2004; Kim *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011).

1.5 - Glutathione-S-Transferase

As glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) caracterizam-se por serem um grupo heterogéneo de enzimas desintoxicantes das células, que catalisam a conjugação do tripéptido glutathione (GSH) em sítios electrofílicos numa vasta gama de substratos fitotóxicos. Este grupo de enzimas é composto por uma diversa família de proteínas solúveis, codificadas a partir de famílias multigénicas (Wilce & Parker, 1994; Edwards *et al.*, 2000, Dixon *et al.*, 2002), com uma massa molecular de cerca de 50 kDa, sendo cada uma composta por duas subunidades polipeptídicas de aproximadamente 26 kDa, e um ponto isoelétrico entre 4-5 (Dixon *et al.*, 2002). Cada subunidade contém dois domínios distintos (o domínio N-terminal e o domínio C-terminal) e um sítio ativo consistindo num sítio GSH (sítio G) e um sítio hidrofóbico (sítio H).

As GSTs são conhecidas pela sua resposta a inúmeros stresses endógenos e xenobióticos como por exemplo na desintoxicação herbicida (Cho & Kong, 2007) e são na sua maioria enzimas citoplasmáticas solúveis (Board *et al.*, 2000).

1.5.1 - Classificação das GSTs de plantas

As GSTs solúveis de plantas foram classificadas de acordo com a proximidade de sequência, reações imunológicas cruzadas, propriedades cinéticas e organizações do genoma, em oito classes: phi (F), tau (U), zeta (Z), teta (T), lambda (L), desidroascorbato

redutase (DHAR), EF1By e tetraclorohidroquinona dehalogenase (TCHQD; Oakley, 2005; Lan *et al.*, 2009; Dixon & Edwards, 2010; Jain *et al.*, 2010). Entre elas, as classes phi, tau, lambda e DHAR são as principais em plantas (Jiang *et al.*, 2010). Projetos de genômica e análises de genes indicam que as plantas têm mais de 40 genes que codificam GSTs com aproximadamente 10% de identidade de aminoácidos (Thom *et al.*, 2002). Dentro da mesma classe, contudo, as subunidades podem formar dímeros mesmo que difiram um pouco na sequência de aminoácidos (Dixon *et al.*, 2003).

As GSTs das classes phi e tau, que estão entre as GSTs específicas de plantas, são as mais abundantes e estão principalmente envolvidas no metabolismo de xenobióticos, por exemplo catalisando a desintoxicação de herbicidas em culturas e ervas daninhas e desempenhando um papel importante no desenvolvimento da planta, na tolerância ao stresse e metabolismo secundário (Neuefeind *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 2003; Edwards & Dixon, 2005; Cho & Kong, 2007). Os membros das GSTs tau sobrepondo-se na função, diferem na sua especificidade para o substrato, fornecendo assim à planta uma ampla gama de proteção.

1.5.2 – Estrutura das GSTs de plantas

Até à data, estão estudadas as estruturas cristalinas de mais de 200 GSTs solúveis, presentes nas principais classes de plantas, animais e bactérias. A maioria das GSTs citosólicas são enzimaticamente ativas como dímeros, homo- ou heterodímeros (subunidades entre 23 e 30 kDa). As únicas GSTs de plantas monoméricas ativas são as GSTs lambda de *Arabidopsis* e DHARs (Frova, 2003). Apesar da pouca similaridade nas sequências primárias das diferentes classes, todas as estruturas tridimensionais são constituídas por dois domínios, o que sugere uma grande pressão evolutiva na conservação de alguns motivos estruturais envolvidos no sítio ativo (Xiao *et al.*, 1996, Sheehan *et al.*, 2001). O domínio N-terminal é bastante conservado e contém resíduos específicos essenciais para a ligação da GSH e atividade catalítica, mais concretamente a Ser17 das classes phi e tau. O grupo hidroxilo da Ser, que mostrou ser essencial na catálise de diferentes GST (Öztetik, 2008), atua como dador de hidrogénio, promovendo a formação e estabilização do anião tiolato. A mutagénese dirigida deste resíduo confirma a sua importância na catálise (Frova, 2006). Como mencionado anteriormente, as classes lambda e DHAR são as únicas GSTs

monoméricas com atividade catalítica. Estas classes específicas de planta têm um resíduo de cisteína no sítio ativo em vez de uma Ser ou uma Tir. Este resíduo promove a formação de ligações dissulfureto com a glutatona, em vez da formação do anião tiolato (Frova, 2006).

1.5.3 - Função das GSTs de plantas

As funções das GSTs em plantas são diversificadas e podem estar relacionadas com a capacidade de conjugar a glutatona (GSH) a diferentes alvos envolvidos em stresses bióticos e abióticos (Jiang *et al.*, 2010). Estas enzimas podem ser induzidas por uma grande variedade de fito-hormonas, incluindo o etileno, auxina, metil jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico (Wagner *et al.*, 2002; Moons, 2003; Smith *et al.*, 2003). Todas estas hormonas regulam muitos aspetos do desenvolvimento vegetal o que implica que as GSTs poderão ter um papel vital no crescimento e desenvolvimento de plantas (Jiang *et al.*, 2010). Os genes que codificam as GST podem ainda ser induzidos por diversos fatores exógenos tais como ataque de agentes patogénicos, metais pesados, choque térmico ou fermento (Singla *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010). A presença de GST durante as simbioses entre plantas leguminosas e actinorrízicas e bactérias fixadoras de azoto tem sido relacionada com o sistema de funcionamento e proteção do nódulo (Minchin *et al.*, 2008; Becana *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011).

1.5.4 - Evolução das GST de plantas

As GSTs com atividade desintoxicante encontram-se distribuídas pelos organismos aeróbios e pensa-se que poderão ter evoluído das bactérias aeróbias dada a sua capacidade de prevenir toxicidade pelo oxigénio (Mannervik & Danielson, 1988; Pemble & Taylor, 1992). As GSTs constituem uma superfamília de proteínas muito antiga que se pensa ter evoluído a partir de um antepassado tipo tiorredoxina dado o seu envolvimento em situações de stresse oxidativo (Martin, 1995; Sheehan *et al.*, 2001). Com a disponibilidade cada vez maior de informação de sequências de aminoácidos e estruturas terciárias, tornou-se evidente que as GSTs estão relacionadas com outras proteínas de ligação a GSH e cisteína, como são exemplo proteínas de plantas de resistência a agentes patogénicos/stresse, a proteína URE2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Rossjohn *et al.*, 1996), fator 1Y de eucariotas envolvido

no alongamento (Sheehan et al., 2001) e fator de inibição de macrófagos (Blocki et al., 1992; Sheehan et al., 2001).

A grande diversidade de funções das GSTs no metabolismo celular depende da sua capacidade de resposta a vários xenobióticos. Segundo alguns autores, uma duplicação de genes, *crossing over*, *splicing* alternativo (em torno da região C-terminal da GST) (Armstrong, 1998; Wongsantichon & Ketterman, 2005), troca e mutagénese (em torno da região N-terminal GSTs) e provavelmente outros mecanismos que se desconhecem, conduziram a uma considerável diversificação de sequências, heterogeneidade de funções e consequentemente à evolução das GSTs. A análise filogenética sugere ainda que todas as GSTs solúveis surgiram a partir de um gene ancestral comum, através de vias tanto convergentes como divergentes (Wilce & Parker, 1994).

I.6 - Objetivos

As plantas actinorrízicas apresentam grande resiliência a ambientes extremos, sendo capazes de prosperar sob uma grande variedade de stresses ambientais tais como salinidade, metais pesados ou pH. Como tal, são de extrema importância ambiental e amplamente utilizadas na recuperação de solos, sistemas agroflorestais, restauração costeira ou prevenção da desertificação. A importância ambiental deste grupo de plantas é reforçada pela capacidade simbiótica com bactérias fixadoras de azoto do género *Frankia*. Assim, vários estudos têm vindo a ser realizados, com o objetivo de caracterizar os mecanismos de adaptação a condições ambientais recalcitrantes, os mecanismos associados ao processo simbiótico e a relação entre a simbiose e a tolerância ao stresse.

Com o objetivo de analisar o papel de genes de defesa em simbioses actinorrízicas, foram isolados e caracterizados diversos genes relacionados com o stresse a partir de nódulos de *Casuarina glauca* (Fortunato, 2006, Fortunato et al., 2007; Santos et al., 2008). Com base nos padrões de expressão, foram selecionados cinco (*CgChi1*, *CgChi3*, *CgGst*, *CgHin1* e *CgPox4*), para análise funcional das respetivas proteínas. Devido a dificuldades na amplificação das regiões codificantes e na otimização das condições de sobre-expressão, optou-se por seguir apenas com a expressão e caracterização bioquímica de dois genes, *CgChi3*, codificador de uma quitinase da classe III, e *CgGst*, codificador de uma glutational S-transferase. O gene *CgChi3* é um dos únicos genes de defesa expressos especificamente em

nódulos, cuja atividade parece estar exclusivamente associada ao processo de desenvolvimento do nódulo (Fortunato *et al.*, 2007). Por outro lado, a proteína codificada pelo gene CgGst parece estar envolvida na proteção contra danos causados pelo stresse oxidativo (Santos *et al.*, 2010). Foi feita a amplificação das regiões codificantes de cada um dos genes, seguida de clonagem no respetivo vetor, sobre-expressão em *Escherichia coli*, purificação das proteínas recombinantes e sua caracterização bioquímica, de modo a contribuir para o esclarecimento do seu papel na simbiose. No caso da CgCHI3, foram ainda realizados ensaios biológicos para testar a eventual atividade antifúngica e/ou bactericida, bem como o efeito em bactérias simbióticas.

Capítulo II – Materiais e Métodos

Este capítulo tem como objetivo apresentar as metodologias utilizadas para sobre-expressão e caracterização bioquímica de duas proteínas recombinantes de *Casuarina glauca* produzidas em *Escherichia coli*, quitinase da classe 3 (CgCHI3) e glutathione S-transferase (CgGST).

II.1 – Materiais

II.1.1 – Material vegetal

As plantas de *C. glauca* foram propagadas a partir de sementes fornecidas pela **B & T World Seeds**, Pagnignan, 34210 Aigues-Vives, France (<http://b-and-t-world-seeds.com>) segundo o protocolo de Zhong et al. (2010).

II.1.2 – A bactéria *Frankia*

Para nodulação de *C. glauca* foi utilizada a estirpe bacteriana *Frankia* Thr, isolada de nódulos de *C. cunninghamiana* no Egito (Girgis et al., 1990).

II.1.3 – Plasmídeos

A clonagem da região codificante (ORF-Open Reading Frame) dos genes de interesse (CgChi3 e CgGst) foi efetuada no vetor pJET1.2/blunt da Fermentas (Vilnius, Lituânia) (Figura II.1) e a subclonagem para a sobre-expressão nos vetores pET-21c (CgGST) e pET-28b (CgCHI3) da Novagen (Darmstadt, Alemanha) (Figura II.2).

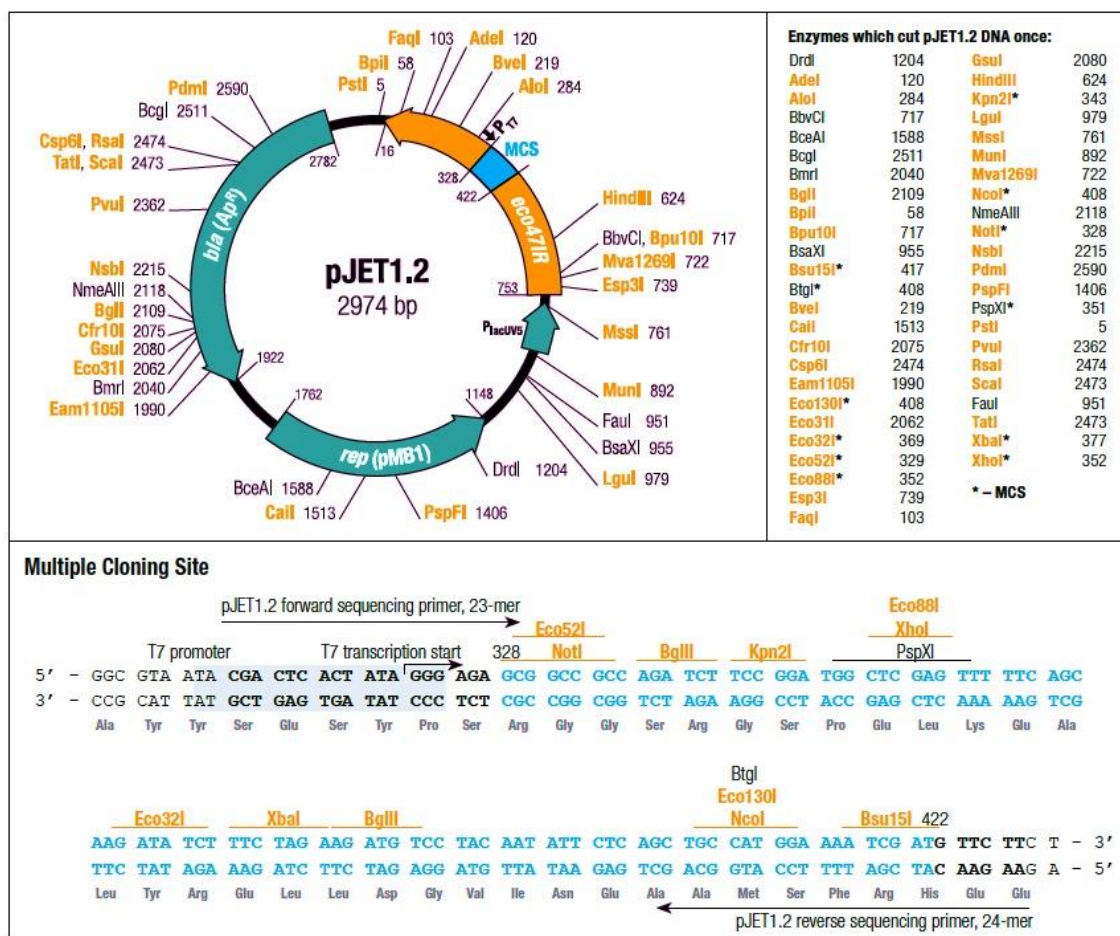


Figura II.1 – Mapa do vetor pJET1.2/blunt e sequência de DNA da região MCS (Multiple cloning site). Em destaque estão os sítios de restrição, origens de replicação, genes marcadores de seleção e região promotora (fonte: <http://WWW.fermentas.com>).

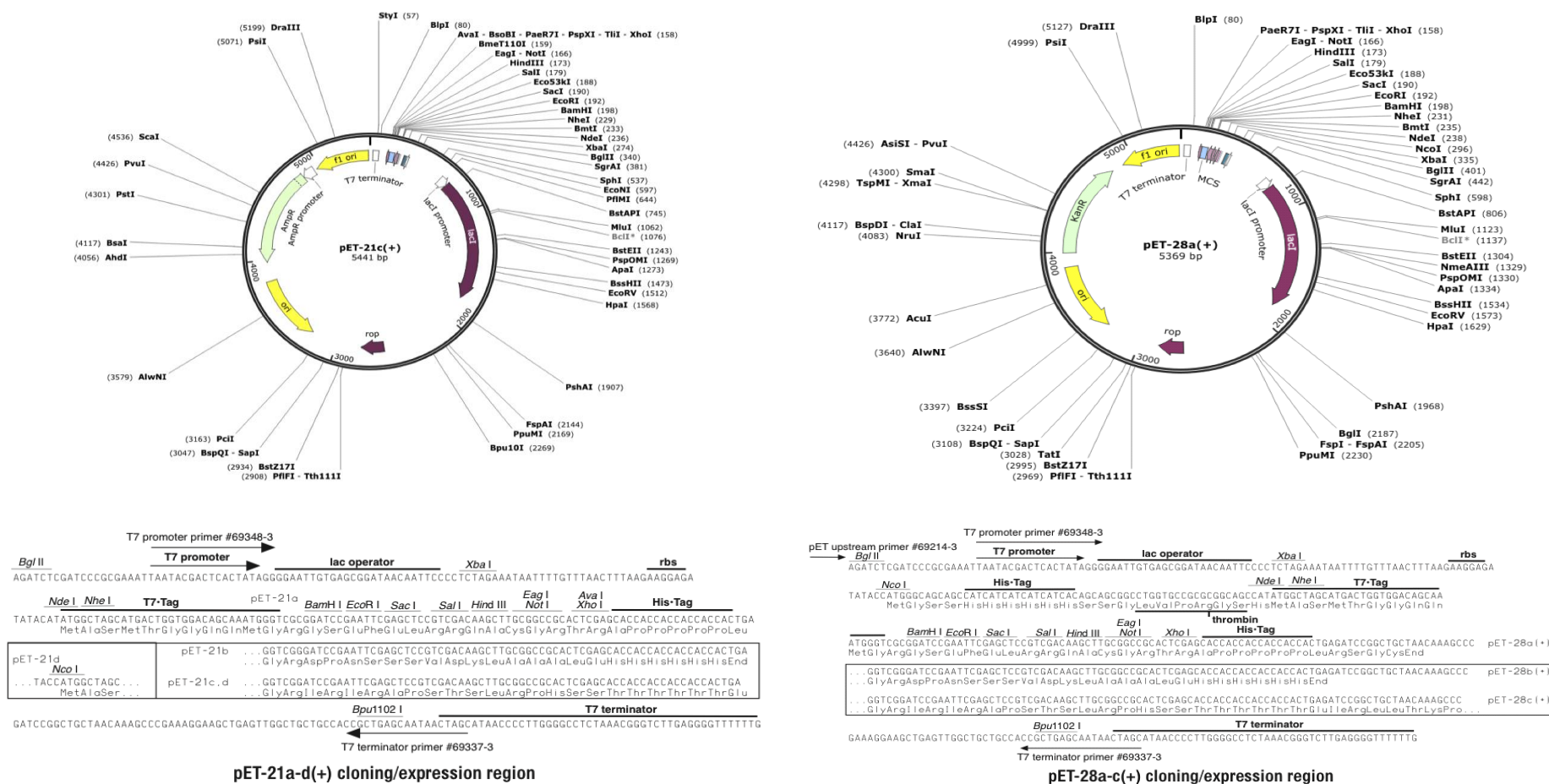


Figura II.2 – Mapas dos vetores de expressão pET-21c e pET-28b usados na clonagem dos genes da CgGST e CgCHI₃, respectivamente. Os plasmídeos contêm o gene *lacI*, o promotor de transcrição T7, a região do operador *lac* e um sítio de clonagem (MCS). Adicionalmente possuem um gene que confere resistência à ampicilina (pET-21c) e canamicina (pET-28b).

II.2 – Métodos

II.2.1 – Condições de crescimento de *C. glauca*

A germinação das sementes foi efetuada numa mistura de turfa:areia:vermiculite (1,5:2:1) (Figura II.3A), no escuro à temperatura ambiente. Quando a parte aérea atingiu aproximadamente 8 cm, as plântulas foram transferidas para meio líquido BD modificado (Tabela II.1) e mantidas em hidroponia numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas ($196 \times 10 \text{ E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 26 °C/22 °C (dia/noite). Para propagação vegetativa, foram destacados 3-4 cm da parte inferior de ramúsculos de plantas com cerca de 3 meses (Figura II.3B), os quais foram imersos numa solução 50-100 ppm de ácido indol-butírico (IBA) durante 24 h e posteriormente colocados em copos contendo solução nutritiva azotada (Figura II.3C). Após cerca de 20 dias começou a verificar-se o aparecimento de uma pequena estrutura (Figura II.3D), a qual deu origem à raiz após cerca de 10 dias (Figura II.3E).

Tabela II.1 – Composição do meio de Broughton and Dillworth's (BD) modificado.

Macroelementos	
KH_2PO_4	0,5 mM
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	1 mM
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,25 mM
K_2SO_4	0,25 mM
MnSO_4	1 μM
Microelementos	
H_3BO_3	2 μM
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,5 μM
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
$\text{Na}_2\text{O}_4 \text{ Mo}.2\text{H}_2\text{O}$	0,1 μM
$\text{CoSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,1 μM
Na_2EDTA	9,3 mg.L^{-1}
FeSO_4	6,9 mg.L^{-1}
KNO_3	0,5 g.L^{-1}

As plantas com cerca de 6 meses foram transferidas para meio líquido sem azoto e inoculadas com uma cultura da bactéria *Frankia* Thr ao fim de 2 semanas.

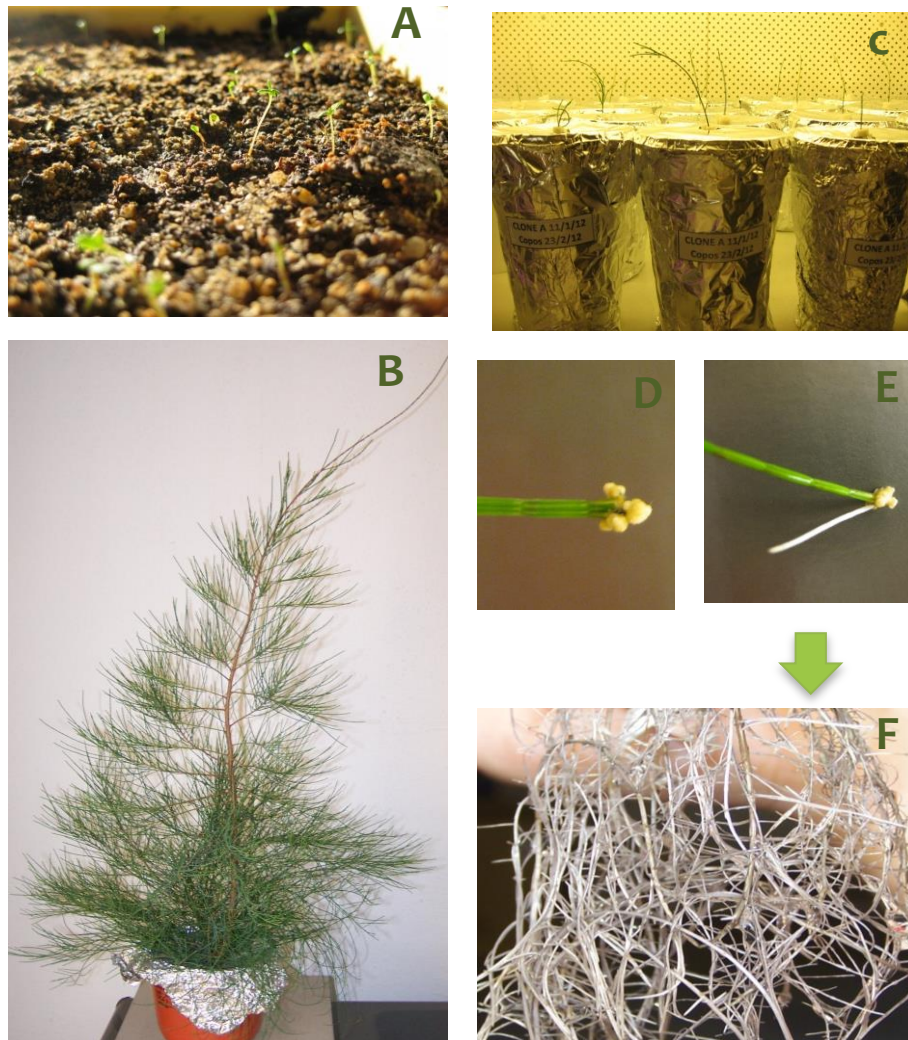


Figura II.3 – Propagação de plantas *C. glauca*. A) Sementeira com 7 semanas; B) Planta com 3 meses C) Individualização de ramúsculos; D) e E) Estrutura de pré-enraizamento; F) Raiz.

II.2.2 – Cultura de *Frankia*

A cultura bacteriana de *Frankia* Thr (Girgis *et al.*, 1990), foi efetuada em meio BAP-PCM (Tabela II.2), a 26 °C, no escuro, segundo o protocolo descrito por Schwencke (1991). A cada 10-30 dias, foi efetuada uma nova subcultura: as células foram centrifugadas a 3200xg durante 10 minutos a 20 °C (centrífuga Hermle Z200A), o precipitado foi ressuspensado em 10 ml de água estéril e centrifugado novamente. As células foram então ressuspensas em 5 ml de água e transferidas para um tubo de 15 ml. Com a ajuda de uma seringa e agulha de 10 ml

(0,7x30 mm) as hifas de *Frankia* foram partidas por aspiração (aproximadamente 10 vezes) e usadas para inocular 200 ml de meio fresco. A cultura foi mantida no escuro, com agitação, durante 3 dias e usada para inoculação de *C. glauca*.

Tabela II.2 – Composição do meio BAP-PCM para a cultura de *Frankia*.

Macroelementos	Por Litro
NH_4Cl	0,267 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Propionato de sódio	0,48 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{Fe} \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$	0,01 g
Microelementos	
H_3BO_3	2,86 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 mg
$\text{Na}_2\text{O}_4\text{Mo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0001 mg
Vitaminas	
Dicloreto de tiamina	10 mg
Ácido nicotínico	50 µg
Monocloreto de piridoxina	50 µg
Ácido fólico	10 µg
Pantotenato de cálcio	10 µg
Riboflavina	10 µg
Biotina	22,5 µg
MES/Tris 0,5 M pH 6.8	20 ml
Fosfatidilcolina	0,86 mg

II.2.3 – Nodulação

Aproximadamente 200 ml de cultura de *Frankia* Thr foram centrifugados a 3200xg, durante 10 minutos a 20 °C (centrífuga Hermle Z200A); as células foram ressuspensas em água estéril e centrifugadas novamente para remoção completa do meio. Para efeitos de inoculação, as células foram ressuspensas em água (50 ml por vaso) e adicionadas ao meio de cultura da planta. Os primeiros nódulos começaram a aparecer 3 a 5 semanas após inoculação (Figura II.4).

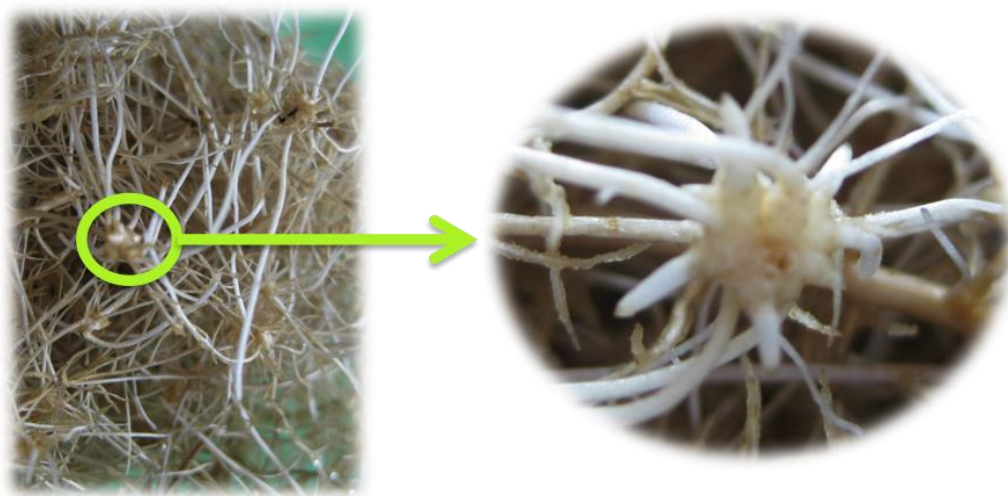


Figura II.4 – Raízes contendo nódulos jovens de *C. glauca*.

II.2.4 – Extração de ácidos nucleicos

II.2.4.1 – Extração de DNA e RNA

As extrações de DNA e RNA, foram efetuadas recorrendo aos kits de extração “DNeasy Plant Maxi” (Qiagen, Alemanha) e “RNeasy Plant Maxi Kit” (Qiagen, Alemanha), respetivamente, seguindo as instruções do fabricante. O grau de pureza e quantidade de DNA e RNA, foram calculados por leitura espectrofotométrica da absorvância a 260 e 280 nm (Lambda EZ201, Perkin Elmer, USA). A integridade do DNA foi aferida por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, contendo 0,1 g/ml de brometo de etídio (EtBr) (Sigma, Espanha) em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, pH 8, 0, 1 mM EDTA) (anexo 1).

II.2.4.2 – Síntese de cDNA (transcrição reversa)

O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa com o kit “Cloned AMV Reverse Transcriptase” (Invitrogen, USA) de acordo com as indicações do fabricante (Tabela II.3).

Tabela II.3 – Composição da reação para síntese de cDNA.

Componentes	Concentração Final
RNA total	1 µg
Oligo-dt (12-18)	100 ng
dNTPs	1 mM
cDNA synthesis buffer	1x
DTT	0,1 M
RNase OUT	40 U
Cloned AMV-RT	15 U
Água estéril	Até 20 µl

II.2.5 – Amplificação da região codificante (ORF) dos genes *CgChi3* e *CgGst*

A sequência codificante dos genes *Cgchi3* e *CgGst*, foi amplificada num termociclador iQ5 (BIO-RAD, USA), utilizando oligonucleótidos iniciadores desenhados com base na sequência completa dos respetivos cDNAs (GenBank *accession number* EF134410 e EU346697) (Tabela II.4) e variando as quantidades de DNA genómico (gDNA) e de cDNA, as concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) bem como a temperatura de emparelhamento. Foi também testada uma *Taq* polimerase do DNA *Proofreading* (Clontech, USA). As condições testadas encontram-se descritas na Tabela II.4. Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C durante 30 segundos; emparelhamento (ver Tabela II.4) por 30 segundos; e extensão a 72 °C por 30 segundos. Foi realizada uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos e a paragem da reação a 4 °C. Para cada gene foram clonados e sequenciados seis produtos de PCR (II.2.6). Posteriormente foram desenhados oligonucleótidos iniciadores específicos para a mesma região, contendo os locais de restrição das enzimas selecionadas para clonagem de

cada um dos genes nos respectivos vetores de clonagem (II.2.7), utilizando as condições otimizadas (Tabela II.5).

Tabela II.4 – Otimização das condições de amplificação da ORF dos genes *CgChi3* e *CgGst*.

Condições testadas	<i>CgChi3</i>	<i>CgGst</i>
cDNA (μg)	0,5	0,5
DNA (μg)	0,45 1,125	-----
[MgCl ₂] (mM)	1,5 3	1,5
T _{hibridação} (°C)	50 55	60 62 68
Oligonucleótido iniciador ORF – Fwd	5' – ATGGCATTGTGACAACTCTTCC – 3'	5' – ATGGCGGACGAAGTGGTTCT – 3'
Oligonucleótido iniciador ORF – Rev	5' – TTAGACATGGCCCTTAATGG – 3'	5' – CTAATCCATGCCAATCTTCTT – 3'
Tamanho esperado do fragmento (bp)	897	660

Tabela II.5 – Condições de reamplificação da ORF dos genes *CgChi3* e *CgGst* para subclonagem nos vetores de expressão.

Condições testadas	<i>CgChi3</i>	<i>CgGst</i>
Quantidade pDNA (ng)	1	1 2,5
T _{hibridação} (°C)	55	68
Oligonucleótido iniciador ORFSR – Fwd (ng)	50	50
Oligonucleótido iniciador ORFSR – Rev (ng)	50	50
Tamanho esperado do fragmento (bp)	897	660

II.2.6 – Clonagem e amplificação dos plasmídeos em *Escherichia coli* DH5α

Os produtos da PCR correspondentes às ORFs dos genes *CgChi3* e *CgGst* (*CgChi3*-ORF e *CgGst*-ORF) foram ligados ao vetor de clonagem pJET, recorrendo ao kit de clonagem “CloneJET™ PCR Cloning Kit” (Fermentas, Lituânia), de acordo com as instruções do fabricante (Tabela II.6). O produto da reação de ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, de acordo com Sambrook *et al* (1989) (anexo 4). As células

transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB-agar (anexo 2) e ampicilina (100 µg/ml).

Tabela II.6 – Composição da reação de ligação do pJET aos produtos da PCR.

Componentes	Quantidade
10 x tampão H	1 x
Produto de PCR não purificado	1 µl
DNA Blunting enzyme	1 µl
pJET1.2/blunt cloning vetor	50 ng
T4 DNA ligase	5 U
Água estéril	Até 20 µl

II.2.6.1 – Purificação e sequenciação dos clones contendo os genes *CgChi3-ORF* e *CgGst-ORF*

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos com o kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas, Lituânia) e sequenciados pela MWG (<http://www.mwg-biotech.com/>). As sequências de nucleótidos obtidas foram comparadas com a sequência original de ambos os genes (GenBank accession number EF134410, Fortunato et al., 2007; e EU346697, Santos et al., 2010), utilizando-se para tal o programa CLUSTAL W (1.83).

II.2.6.2 – Hidrólise e purificação dos plasmídeos linearizados

Os clones positivos selecionados (pJET1.2-*Cgchi3-ORF1* e pJET1.2-*CgGst-ORF4*, doravante designados pJET1.2-*Cgchi3-ORF* e pJET1.2-*CgGst-ORF*) foram usados para inocular 5 ml de meio LB, contendo antibiótico e incubados a 37 °C durante 8 h, com agitação orbital a 200 rpm. A partir de uma diluição de 50x do pré-inóculo, foi efectuada uma sub-cultura nas condições acima descritas por um período de cerca de 18 h, seguindo-se o isolamento do DNA plasmídico (pDNA) usando o kit “Illustra plasmidPrep Midi Flow” (GE Healthcare, Life Sciences, Alemanha). O plasmídeo foi posteriormente quantificado e hidrolisado com as endonucleases de restrição *Nde I* e *Sal I* (Fermentas, Lituânia) a 37 °C durante 1 h 30m. O

mesmo procedimento foi realizado em paralelo com os vetores de expressão. As condições de reação encontram-se na Tabela II.7.

Tabela II.7 – Composição da reação de hidrólise dos vetores de expressão pET-21c e pET-28b e dos vetores de clonagem contendo os genes que codificam as proteínas de interesse.

Componente	Quantidade na reação pET/pDNA
2 x tampão de reação	1 x
DNA a hidrolisar	1 µg
<i>Nde</i> I (10 U/µl, Fermentas)	20 U
<i>Sal</i> I (10 U/µl, Fermentas)	20 U
Água MQ estéril	Até 50 µl

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes *CgChi3-ORF* e *CgGst-ORF* foram purificados do gel de agarose usando o kit de purificação “High Pure PCR Product Purification” (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) e quantificados espectrofotometricamente e por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

II.2.7 – Sub-clonagem de *CgChi3-ORF* e *CgGst-ORF* nos vetores de expressão

A clonagem dos genes de interesse foi efetuada em 2 plasmídeos da série pET (Novagen, Darmstadt, Alemanha): pET-21c e pET-28b (Figura II.2), contendo o pET-21c uma cauda de histidina (6xHis) na região N-terminal e o pET-28b duas caudas de histidina, uma na região C-terminal e outra na região N-terminal, para além de um gene de resistência à ampicilina e canamicina, respetivamente. Para a construção do vetor de sobre-expressão procedeu-se à ligação do fragmento purificado ao respetivo vetor linearizado, com a enzima T4 DNA ligase (Fermentas, Lituânia). As condições da reação de ligação são apresentadas na Tabela II.8. As reações de ligação decorreram a 23 °C durante 60 min.

Para o cálculo da quantidade de DNA e vetor a utilizar na ligação recorreu-se à formula seguinte:

$$\text{Quantificação (}\mu\text{g)} = \text{n}^{\circ} \text{ fmol} \times \frac{1 \mu\text{g}}{3000 \text{ fmol}} \times \frac{\text{tamanho do fragmento (bp)}}{1000 \text{ bp}}$$

Tabela II.8 – Composição da reação de ligação dos vetores pET-28b e pET-21c a CgChi3-ORF e CgGst-ORF.

Componentes	Quantidade na Reação CgChi3/CgGst
5x tampão da T4 DNA ligase	1
Racio inserto:vetor	3:1
ddpET ¹	30 fmol
ddDNA ²	90 fmol
T4 DNA ligase (10 U/μl, Fermentas)	5 U
Água MQ estéril	Até 20 μl

1 - ddpET corresponde ao vetor duplamente hidrolisado com *Nde* I e *Sal* I

2 - ddDNA corresponde ao fragmento duplamente hidrolisado com *Nde* I e *Sal* I

O produto da reação de ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* DH5α como descrito acima. Os transformantes foram depois plaqueados em placas de Petri contendo meio LB-agar (anexo 2) na presença de antibiótico (30 μg/ml canamicina e 100 μg/ml ampicilina, respetivamente). A seleção dos clones positivos foi realizada por PCR em 4 colónias, usando as condições anteriormente descritas. A partir dos clones positivos isolaram-se os DNA plasmídicos com o kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas, Lituânia). Os quatro pDNA foram sequenciados utilizando os oligonucleótidos iniciadores específicos para o plasmídeo pET, com o objetivo de confirmar a sequência clonada.

II.2.8 – Sobreprodução das proteínas recombinantes em *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Para a expressão heteróloga de proteínas são geralmente usadas as células *E. coli* BL21 (DE3). Esta estirpe tem uma supressão no gene que codifica as proteases *lon* e o *ompT*, resultando na produção das proteínas recombinantes intactas. Adicionalmente caracteriza-se por ter sido infetada pelo fago DE3, transportando uma cópia do promotor T7 da RNA polimerase, que controla a expressão proteica (pET System, Alemanha).

Transformaram-se células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Alemanha) com um dos clones positivos (pET28b-CgCHI3-ORF e pET21c-CgGST-ORF), por choque térmico seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al* (1989) (anexo 4). A partir das células

transformadas inoculou-se meio LB contendo antibiótico para preparar stocks de glicerol (anexo 3) que se mantiveram congelados a -80°C para os estudos de expressão.

II.2.9 – Expressão das proteínas recombinantes

Os primeiros ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21 (DE3) e tiveram como objetivo estabelecer as condições ótimas de concentração do agente indutor isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), temperatura e tempo de expressão, de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade.

II.2.9.1 – Ensaios em pequena escala

Como primeira aproximação, foram realizados ensaios de expressão em pequena escala (100 ml de meio em Erlenmeyers de 250 ml) e a baixa densidade ótica ($\text{OD}_{600\text{ nm}}=0,5-0,6$), variando as concentrações de IPTG (0, 0,1 e 0,5 mM), temperatura (37°C) e tempo de indução (0, 1, 2, 3 e 16 h) (Tabela II.9). Iniciou-se com um pré-inóculo de 5 ml de meio LB contendo antibiótico (canamicina para pET28b-CgCHI3-ORF e ampicilina para pET21c-CgGST-ORF) e uma colónia da proteína recombinante, a 37°C com uma agitação de 210 rpm por cerca de 16 h numa incubadora com agitação orbital (10-O+ACOPE, Ovan, USA). O pré-inóculo foi diluído 100x em 100 ml de meio LB com o antibiótico apropriado e incubado a 37°C com uma agitação de 210 rpm até atingir uma $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ entre 0,5 e 0,6. Neste ponto adicionou-se o indutor IPTG (Figura II.5). Foram retiradas alíquotas de 5 ml a diferentes tempos de indução e calculados os volumes a aplicar no gel de eletroforese (SDS-PAGE) para cada amostra com base na fórmula:

$$\text{Volume de meio de cultura (ml)} = 1,2/\text{OD}_{600\text{nm}}$$

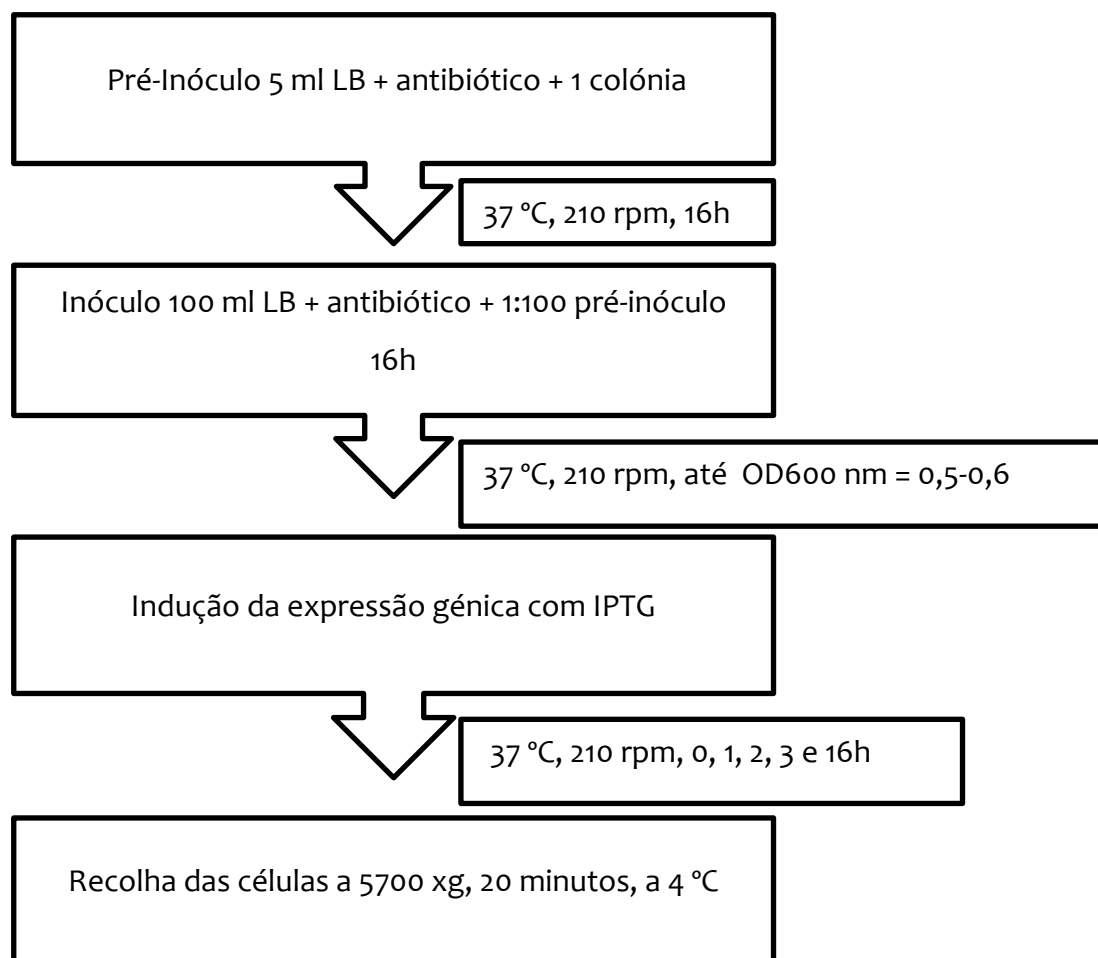


Figura II.5 – Esquema do protocolo usado para otimização das condições de sobre-expressão das proteínas recombinantes CgCHI3 e CgGST.

Tabela II.9 – Otimização das condições de sobre-expressão das proteínas recombinantes.

Proteína recombinante	OD _{600 nm} na altura da indução	[IPTG] (mM)	Tempo de indução (h)	Temperatura (°C)
CgCHI3	0,5-0,6	0	0	37
		0,1	3	
		0,5	16	
CgGST	0,5-0,6	0	0	37
		0,5	3	
			16	

O perfil proteico de todas as amostras recolhidas ao longo da cultura celular foi posteriormente analisado por SDS-PAGE em géis de acrilamida a 12%. As células de cada

amostra foram sedimentadas por centrifugação a 5700xg numa centrífuga *Sigma 3-18 K* (Espanha), durante 20 minutos a 4 °C. Ao sedimentado das células adicionaram-se 40 µl de tampão de amostra (anexo 4). Após incubação durante 5 minutos a 100 °C, foram aplicados 15 µl em gel de SDS-PAGE 12% e escolhidas as melhores condições de expressão.

II.2.9.2 – Ensaaios em larga escala

A sobre-expressão em larga escala foi realizada utilizando-se como pré-inóculo 5 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado e 1 colónia recombinante, sob agitação a 210 rpm por 8 h a 37 °C. O pré-inóculo foi diluído 100x em 50 ml de meio LB contendo antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação a 210 rpm, durante mais 16 h. A cultura da noite foi diluída 100x em 1 l de meio LB contendo antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação a 210 rpm até atingir OD_{600 nm} entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com a concentração de IPTG ótima (0,1 mM para CgCHI3 e 0,5 mM para CgGST) e mantida sob agitação a 210 rpm num agitador orbital. Após 3 h de crescimento induzido, a cultura foi centrifugada a 5700xg por 30 minutos a 4 °C e o sedimento celular ressuspensão em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,6. As células foram armazenadas a -80 °C para posterior utilização (II.2.10).

II.2.10 – Purificação das proteínas recombinantes

Antes de iniciar a purificação das proteínas em estudo fez-se o fracionamento celular para se poder avaliar a sua localização e clarificar o extrato proteico. Para isso procedeu-se à desintegração das células em duas etapas. Na primeira fase efetuaram-se 3 a 4 ciclos de congelação em azoto líquido seguidos de descongelação rápida sob água corrente; na segunda fase fez-se passar a suspensão celular contendo alguns cristais de DNase I de pâncreas bovino (Sigma, Espanha) numa *French Pressure Cell Press* (Thermo Electron Corporation, USA) à pressão de 1700 psi. A suspensão celular resultante foi centrifugada a 5700xg durante 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi ultracentrifugado (Beckman *Optima LE-80 K* com rotor 70 Ti, USA) a 225072xg durante 1 h a 4 °C, de modo a separar a fração solúvel da fração membrana. Recolheu-se a fração solúvel, designada extrato proteico. Para impedir a ação de proteases celulares, adicionaram-se à suspensão celular inibidores de proteólise (10 mM de benzamidina e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF -

previamente dissolvido em isopropanol). O procedimento do crescimento e fracionamento celular encontra-se esquematizado na Figura II.6.

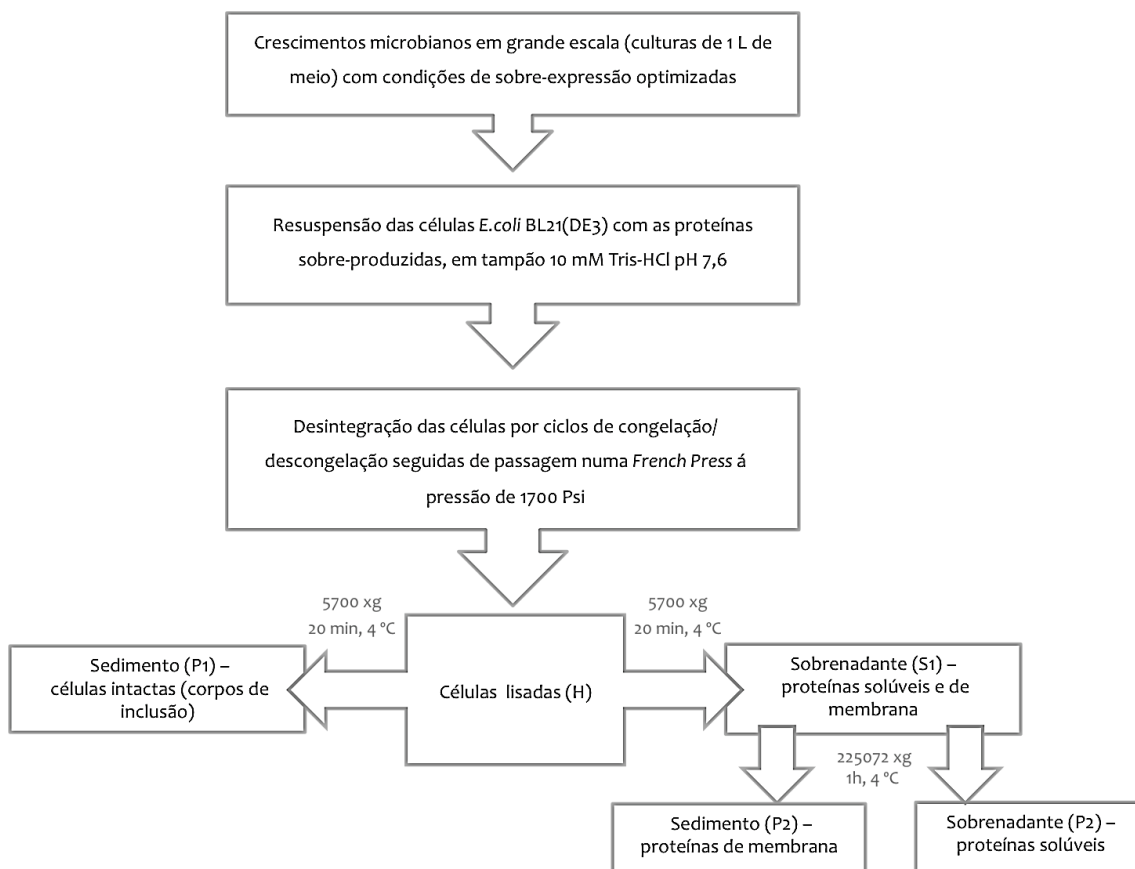


Figura II.6 – Esquema do procedimento efetuado para obtenção do extrato proteico solúvel para purificação das proteínas recombinantes CgCHI3 e CgGST produzidas em *E. coli*.

II.2.10.1 – Solubilização da CgCHI3 a partir dos corpos de inclusão

A solubilização da proteína recombinante CgCHI3 dos corpos de inclusão foi realizada usando o procedimento descrito por Kirubakaran & Sakthivel (2007), com uma pequena modificação. A adição de β -mercaptoetanol (2,5 mM) foi substituída por um tampão redox composto por GSH (3 mM) / GSSG (0,3 mM) (Sigma, Espanha) (Tabela II.10). O sedimento contendo os corpos de inclusão, resultante da centrifugação a baixa velocidade (sedimento P1) foi lavado com 3 volumes de tampão de lavagem. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 5700xg, 4 °C durante 20 minutos. Posteriormente o detergente foi removido com a lavagem do sedimento utilizando água destilada. O procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes nas condições anteriores. Com a finalidade de renaturar a proteína corretamente a partir dos corpos de inclusão, o

sedimento foi ressuspenso em 10 volumes de tampão desnaturante/renaturante (DR). Após 1 h à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 10000xg durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e dialisado durante a noite contra tampão contendo concentrações decrescentes de ureia (6, 4, 2, 1 e 0 mM, respetivamente). Após a última diálise, centrifugou-se a amostra a 8000xg, 4 °C durante 20 minutos, de forma a separar a fração solúvel.

Tabela II.10 – Composição dos tampões usados na solubilização da proteína recombinante CgCHI3 dos corpos de inclusão.

Tampão de lavagem	Tampão desnaturante-renaturante
10 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,8
300 mM NaCl	5 mM MgCl ₂
1 mM EDTA	2,5 mM β-mercaptoetanol ou 3 mM GSH/ 0,3 mM GSSG
1 % Triton X-100	0,1 % (w / v) Tween 20
1 M Ureia	8 M Ureia

A presença da proteína solubilizada foi analisada num gel desnaturante de poliacrilamida a 12,5%, seguido de *Western Blotting* pela reação positiva com um anticorpo contra quitinase classe III de *Lupinus albus* (tremoceiro) (Regalado *et al.*, 2000) e um anticorpo monoclonal contra histidina (Sigma, Espanha) que reconhece as caudas de afinidade da proteína híbrida. Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), seguindo o protocolo descrito por Regalado & Ricardo (1996).

II.2.10.2 – Purificação da proteína CgCHI3 obtida a partir da solubilização dos corpos de inclusão

A purificação da proteína recombinante foi efetuada no sistema “ÄKTA prime plus” (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) a 4 °C. A solução de proteína solubilizada e renaturada foi centrifugada a 5849xg durante 20 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi filtrado e aplicado na coluna “HisTrap™ FF Columns” de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) equilibrada com o tampão A (Tabela II.11). Após lavagem da coluna com tampão A, as

proteínas adsorvidas à matriz cromatográfica foram eluídas com 100% de tampão B (Tabela II.11) e recolhidas em frações de 1 ml. Foi usado um caudal de 1 ml/min e uma pressão máxima de 3 bar (0,3 MPa).

Tabela II.11 – Composição dos tampões usados na purificação da proteína CgCHI3 por cromatografia de afinidade.

Componentes	Tampão A (tampão de ligação)	Tampão B (tampão de eluição)
Tris-HCl pH 7,8	50 mM	
MgCl ₂	5 mM	
β-mercaptoetanol	2,5 mM	
Tween 20	0,1 %	
Imidazol	20 mM	500 mM

II.2.10.3 – Purificação da proteína GST de *C. glauca* produzida em *E. coli*

A purificação da proteína recombinante GST foi realizada no sistema “ÄKTA prime plus” (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) a 4 °C por cromatografia de afinidade. A proteína solúvel, foi primeiramente dialisada em 2 l de tampão de ligação – PBS pH 7,3 (Tabela II.12), a 4 °C durante aproximadamente 18 h. Recolheu-se o sobrenadante a 8000xg, 4 °C durante 20 minutos e aplicou-se numa coluna de afinidade GSTrap HP 5 ml (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) equilibrada com tampão de ligação. A proteína foi eluída com tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de glutatona reduzida usando um caudal de 5 ml/min e uma pressão máxima de 3 bar (0,3 MPa).

Tabela II.12 – Composição do tampão de ligação usado na purificação da proteína CgGST.

Componentes	Concentração Final
NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

II.2.11 – Análise funcional das proteínas recombinantes

II.2.11.1 – Análise bioinformática

Com base na sequência de aminoácidos de cada proteína recorreu-se a programas informáticos (<http://www.expasy.org/>) para se determinarem alguns parâmetros característicos de cada proteína:

- 1) *SIB Bioinformatics Resource Portal* que permite fazer a tradução de uma sequência proteica a partir de uma sequência de nucleótidos (<http://web.expasy.org/translate/>);
- 2) *ProtParam tool* (Gasteiger *et al.*, 2005) que determina os parâmetros físico-químicos da proteína;
- 3) *PROSCAN* (Prosite scan) que faz a previsão dos domínios da proteína, famílias e sítios funcionais;
- 4) *WoLF PSORT* (Horton *et al.*, 2006) que faz a previsão da localização subcelular da proteína.

II.2.11.2 – Sequenciação da região N-terminal da CgCHI3

De modo a confirmar que a proteína sobreproduzida e purificada corresponde de fato à CgCHI3, determinou-se a sequência de aminoácidos da região N-terminal utilizando a reação de Edman e um sequenciador automático de proteínas Procise 491 HT (Applied Biosystems, USA) no Laboratório Analítico do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa. A amostra em suporte de PVDF, foi preparada seguindo o procedimento utilizado pela unidade de serviços analíticos do IBET.

II.2.11.3 – Quantificação da proteína usando o método do BCA

A quantificação das proteínas recombinantes foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) por deteção colorimétrica.

II.2.11.4 – Análise funcional das proteínas recombinantes

A função da proteína CgCHI3 recombinante foi testada por métodos enzimáticos e ensaios biológicos. Nos testes enzimáticos usaram-se diversos substratos com monitorização espectrofotométrica, enquanto nos ensaios biológicos foram utilizados diferentes fungos e bactérias. Para a CgGST apenas foi testada a atividade através do acoplamento com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Nos ensaios em solução foram realizados 3 replicados independentes e usados os valores médios.

II.2.11.4.1 – Atividade quitinolítica da CgCHI3

A atividade quitinolítica da CgCHI3 foi testada usando as reações de hidrólise enzimática de vários substratos. No primeiro ensaio, a enzima purificada foi incubada com o substrato polimérico, carboximetil-quitina (“Carboxymethyl Chitin Remazol Brilliant Violet” - CM-Chitin-RBV, Loewe Biochemica, Alemanha), um derivado solúvel de quitina, como descrito por Wirth & Wolf (1992). Adicionou-se 0,1 ml de solução de enzima (numa concentração final igual a 2 µg/ml) a 0,2 ml de tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,4 a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de CM-Chitin-RBV (2 mg/ml). Após 10, 30, e 60 min de incubação, as reações foram paradas pela adição de 0,1 ml de 2 N HCl. O material não degradado foi precipitado em gelo durante 10 min e removido por centrifugação a 10000 xg durante 5 min (Eppendorf Personal Microcentrifuge MiniSpin®, Alemanha). O aumento da densidade ótica foi medido, utilizando um espectrofotómetro Beckman (USA) a 550 nm e a atividade foi expressa em unidades (U.) Abs_{550 nm}/min/mg. No segundo ensaio, a atividade quitinolítica foi avaliada usando o kit da Sigma (Espanha) “Chitinase Assay”. Nesta reação há produção de *p*-nitrofenol (4-nitrofenol) que, após ionização a pH básico, pode ser quantificado colorimetricamente por medição da absorvância a 405 nm. Os substratos testados permitiram avaliar a atividade de exoquitinase para a quitobiose (4-nitrofenil N,N'-diacetil-D-quitobiósido) e o 4-nitrofenil 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosídeo, e a atividade de endoquitinase com a quitotriose (4-nitrofenil-D-N,N',N''-triacetilquitotriose).

II.2.11.4.2 – Atividade lisozimática da CgCHI3

A atividade de lisozima da enzima CgCHI3 foi medida pela taxa de lise das paredes celulares da bactéria *Micrococcus lysodeikticus* como descrito por Shugar (1952). A suspensão celular foi preparada através da adição de 9 mg de células de *M. lysodeikticus* (Sigma, Espanha) a 30 ml de tampão 0,1 M fosfato de potássio, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml da solução de enzima a 2,9 ml da suspensão celular e monitorizada continuamente como a diminuição da dispersão de luz a 450 nm utilizando um espectrofotómetro Beckman (USA) a 25 °C durante 30 minutos. Uma unidade da atividade da enzima, é igual à diminuição da absorvância a 450 nm de 0,001 por minuto a pH 7,0 e 25 °C.

II.2.11.4.3 – Atividade β -1,3-glucanase da CgCHI3

A enzima purificada foi misturada com o substrato polimérico, carboximetil curdlan Remazol Brilliant Blue (CM-Curdlan-RBB, Loewe Biochemica, Alemanha), como descrito por Wirth & Wolf (1992). Para o ensaio, 0,1 ml de solução de enzima (2 mg/ml) foram adicionados a 0,2 ml de tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,4 a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de CM-Curdlan-RBB (4 mg/ml). Depois de 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 min de incubação, as reações foram paradas pela adição de 0,1 ml de 2 N HCl. O material não degradado foi precipitado em gelo durante 10 min e separado por centrifugação a 10000xg durante 5 min (Eppendorf Personal Microcentrifuge MiniSpin®, Alemanha). O aumento da densidade ótica foi medido espectrofotometricamente a 600 nm e a atividade foi expressa em U.Abs_{600 nm}/min/mg.

II.2.11.4.4 – Atividade β -1,4-endoglucanase (carboximetil-celulase) da CgCHI3

A atividade de carboximetil-celulase (CM celulase ou CMCase) foi analisada utilizando como substrato sais de sódio de carboximetil-celulose em 0,2 % (w/v) de tampão 50 mM fosfato de potássio-ácido cítrico (PCA) pH 5,2, com a finalidade de verificar a capacidade para hidrolisar polissacáridos lineares de glucose. De acordo com Chen (2004), foram utilizadas as seguintes condições: 0,2 ml de substrato, 0,2 ml de solução de enzima (0,54 mg/ml) e 0,4 ml de tampão PCA. Esta mistura foi incubada a 30 °C durante 5 h sob agitação.

Desta mistura foram retiradas amostras de 0,2 ml aos quais se adicionou 0,8 ml de água destilada e 1 ml de reagente BCA (2,2'-ácido biconínico) (Waffenschmidt & Jaenicke, 1987), seguido de incubação a 100 °C durante 15 min. O método de BCA foi usado, para medir a produção de unidades de açúcares redutores. As amostras foram, em seguida, arrefecidas à temperatura ambiente durante 10 min, e a sua absorvância foi medida a 570 nm.

II.2.11.4.6 – Atividade antifúngica da CgCHI3

O método de difusão em disco foi usado para estudar a atividade antifúngica (Elhamid *et al.*, 2010). O ensaio foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura sólido PDA (“Potato Dextrose Agar”). O micélio de vários tipos de fungos filamentosos fitopatogénicos, *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnose da Mandioca), *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta da Purgueira), gentilmente cedidos pela Doutora Manuela Pinto (Instituto de Investigação Científica Tropical, Portugal), *Trichoderma viride* (tomateiro) e *Fusarium oxysporum* (murcha de fusário do tomateiro) gentilmente cedidos pelo Doutor Matthieu Joosten (Laboratório de Fitopatologia, Universidade de Wageningen, Holanda) foi inoculado no centro das placas. Quando o diâmetro das colónias atingiu 3-4 cm, aplicou-se uma solução de quitinase a diferentes concentrações (0,01 mg e 0,0025 mg) em discos de papel de filtro ou diretamente no meio, seguindo-se a incubação a 25 ± 2 °C. Como controlo positivo foi usada água e tampão de estabilidade da enzima (tampão DR – Tabela II.10). Todas as preparações de enzima, tampão e água foram esterilizadas; cada ensaio foi realizado em triplicado. Após 3 dias, verificou-se o diâmetro dos halos.

II.2.11.4.7 – Atividade antibacteriana da CgCHI3

O método de difusão em disco foi usado para estudar a atividade antibacteriana da CgCHI3. No presente ensaio foram usadas 3 espécies bacterianas: *E. coli* estirpes K12 e BL21 (DE3), *Paracoccus denitrificans* e *Bacillus subtilis* 168 Wild type, gentilmente cedidos pela Doutora Ana Melo (Instituto de Investigação Científica Tropical, Portugal).

O ensaio foi realizado em placas de Petri de 9 centímetros de diâmetro, contendo meio LB-agar. Foi preparado um inóculo de 5 ml de meio LB para cada uma das estirpes bacterianas, que cresceu durante cerca de 16 h a 37 °C. 0,1 ml da cultura foi espalhada na

placa e diferentes concentrações de CgCHI₃ foram aplicadas em discos de papel de filtro estéril e incubados a 37 °C. Como controlo negativo foi usada água e tampão de estabilidade da enzima (tampão DR – Tabela II.10). Todas as preparações de enzima, tampão e água foram esterilizados; cada ensaio foi realizado em triplicado. Após 24 horas, o crescimento foi observado.

II.2.11.4.5 – Efeito da CgCHI₃ no crescimento das bactérias *Frankia* e rizóbio

Utilizando-se o método desenvolvido pelo grupo de investigação do Dr. Philippe Normand, laboratório de simbioses actinorrízicas (Unidade de Ecologia microbiana, CNRS, Universidade de Lyon, França). A proteína recombinante foi testada quanto à sua capacidade de interação com os fatores de nodulação das bactérias simbióticas *Frankia* ACN14a (Normand & Lalonde, 1982) e CCI₃ (Zhang et al., 1984) em *Alnus glutinosa*, uma planta actinorrízica pertencente à família Betulaceae. Separadamente, utilizaram-se 800 µl do sobrenadante das culturas das duas estirpes de *Frankia*: a cada uma das quais se adicionaram 100 µl de 0,1 M acetato de sódio pH 5,4 e 100 µl de enzima pura; como controlo negativo utilizaram-se 400 µl de tampão Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP), 50 µl de 0,1 M acetato de sódio pH 5,4 e 50 µl de enzima pura; como controlo positivo utilizou-se o sobrenadante do meio de cultura de cada uma das bactérias. As reações foram incubadas a 37 °C durante 1 h, dos quais se retirou metade da mistura e se congelou para posterior análise. A outra metade da amostra foi incubada por mais 24 h a 37 °C. Inativou-se a enzima durante 10 min a 70 °C e foram feitas diluições 1:10 de todos os ensaios para um volume final de 1 ml. As plantas foram numeradas de 1 a 7 e inoculadas com 100 µl (~10 µl cada raiz com cerca de 1 cm desde a extremidade). A observação dos resultados foi efetuada diariamente ao microscópio, com o objetivo de se verificar alterações na morfologia das raízes como mostra o procedimento descrito na Figura II.7.

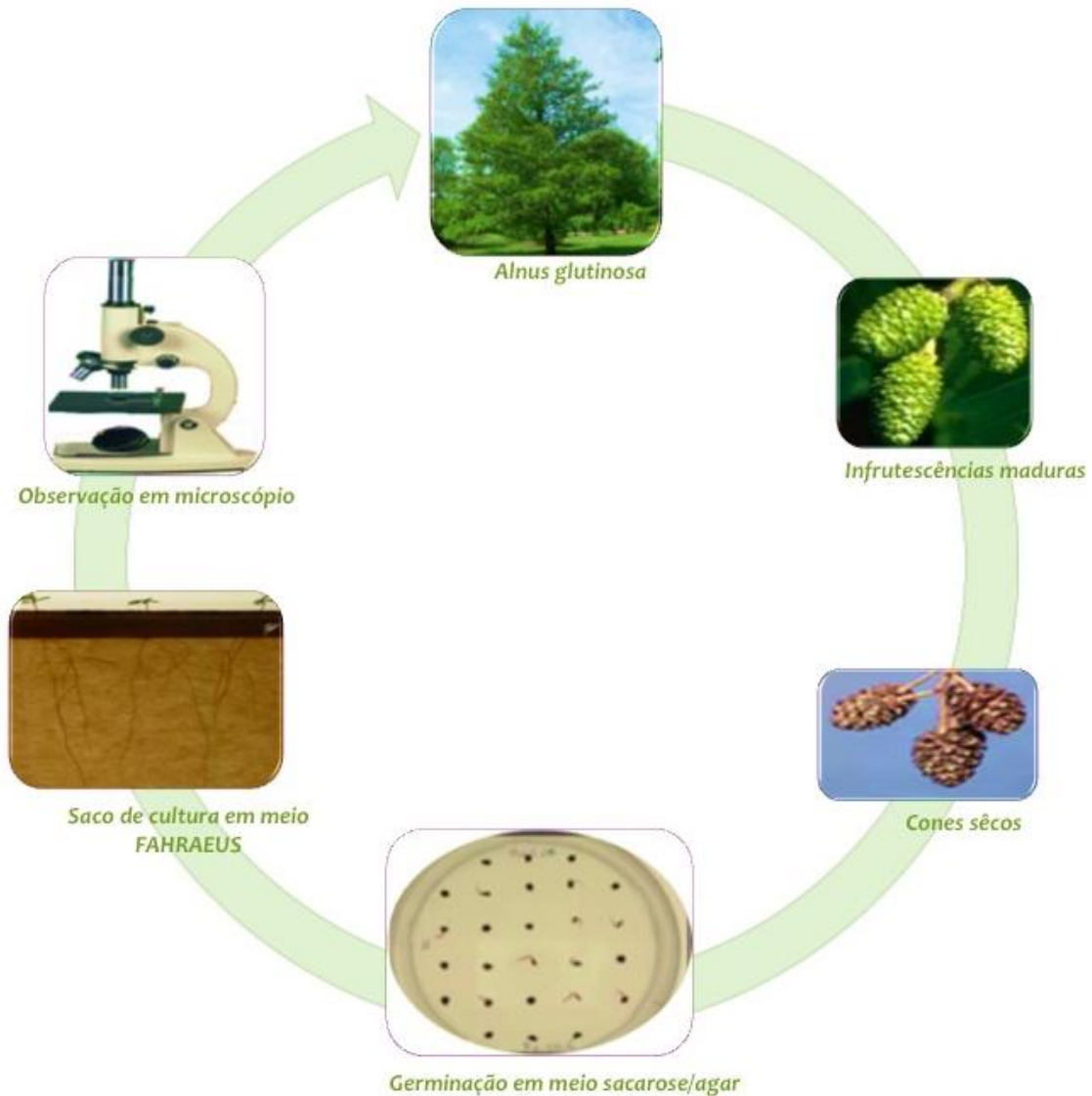


Figura II.7 – Esquema representativo desde a germinação à observação microscópica de *Alnus glutinosa* inoculada com a bactéria *Frankia* e incubada com a enzima CgCHI3 pura.

O efeito da proteína recombinante no crescimento de rizóbio gentilmente cedido pela Doutora Isabel Videira e Castro (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal), foi testado pelo método de difusão em disco (Elhamid *et al.*, 2010). A cultura de rizóbio foi inoculada em meio de extrato de levedura com manitol (YME) contendo discos impregnados com diferentes quantidades de CgCHI3 (0,01 mg e 0,0025 mg). Após incubação a 28 °C durante 24h, efetuou-se a determinação do diâmetro do halo. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

II.2.11.4.8 - Estudo cinético da GST

A atividade de GST foi determinada utilizando um espectrofotômetro Beckman (USA), como descrito por Provost & Wallert (ano). A mistura de ensaio consistiu em 980 µl de 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 6,5, 10 µl de 100 mM de 1-cloro2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 10 µl de 100 mM de glutathiona reduzida (GSH). A reação foi iniciada pela adição de 100 µl de enzima a 900 µl de mistura de ensaio. Monitorizou-se a variação da absorvância a 340 nm durante 30 minutos num espectrofotômetro Beckman (USA) à temperatura ambiente.

Capítulo III – Resultados

III.1 – Desenho de oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificação dos genes que codificam as proteínas em estudo

Com base na sequência completa de cada um dos genes em estudo, *CgChi3*, codificador de uma quitinase da classe III (GenBank accession number [ABL74451.1](#)) e *CgGst*, codificador de uma glutathione S-transferase (GenBank accession number [ABZ80407.1](#)) (Figura III.1), foram desenhados oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos, complementares às extremidades da região codificante (*ORF-Open Reading Frame*), contendo sítios de restrição para posterior hidrólise com endonucleases.

CgChi3

```
ACGCGGGGAGCACAAGATAGATACACATTTCTTCGCACACATTTATACAAATAGCTACAATGGCATTGTTGTACAACTCTTCGGATGT
CTTTCCTTTCTTAGGGATGCTAATGCTTGCAACAAGAGCAAATGCTGGTGAATTGCAATCTACTGGGGTCAAAATGGAAATGAA
GGCACCTTGGCAGAGACTTGTGCCACGGGTAACATACTTTGTGATCATTGCTTCTCTACCAACTTTGGGAATGGTCAAACTCCA
ATGGTTAACTCGCGGGTCATTGTGACCTTATAGTAACGGTTGCACCAATTTAAGCTCTGACATAAAGTCGTGTCAAGCCAAAGG
CATCAAAGTCATCTTTCTCTGGGGTGGGGCTGGAAGTTACTATCTTTCGTCTCTAAGGATGCCAAGCAAGTCGCCACTTACCT
CTGGAATAACTTCTTAGGGGGACAATCATCTTCACGTCCATTTGGACCGCTGTTTTAGACGGAATTGATTTTGACATTGAAGGGGG
GACGAACAAACATTGGAACGAACCTTGAAGGTACCTTTAGGATATAGCAAGCAAGGAAAAAGGTTTACCTAACTGCAGCTCCT
CAATGTCCGTTTCCCGATGCTTGGATCGGAAATGCCCTTAAGACTGGTCTTTTGATTGCGTATGGGTTCAATCTATAACAATCCCC
CTTGCCAATATTCTCCGGTGATATGGCCAATCTTGAAGATGCGTGGAAGCAATGGACCTCGGACATCCCCGCAACAAGATTTTCT
TGGGGTTACCTGCATCTCTGAGGAGCTGGAAGTGTTTATATTCTGTCTCTGACCTTACTTTAAAGTGCTTCCGGCCATTAAGG
GTTCTGCCAAGTATGGAGGTGTGATGTTGTGGTCCAAGTATTATGATGATCAGAGTGGCTATAGCTCTGCCATTAAGGGCCATGTCT
AAGTGAATTAGGCTCTCAAGGTTATGTGTGAACAAGTTCATCTATTGTGAACAATTTATTATATCTAATTGTTGCATTATCTACATGT
CATTCTATGTATGTACTTATCTCTGTATACAATCTAAGTACGTATTTATGTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

CgGst

```
GCGGGGATCCTCTCAGCGTTTCTTTCTTAATCTTTGTTGTAGTGTGTGAGAATGGCGGACGAAGTGGTTCTCCTGGATATGTGGAT
GAGCATGTTTGGGATGAGGGTGAGGCTTGCTCTGATTGAAAAGGGAATCCAGTACGAGTACAAGGAGGAGGACCTGATGAACAA
AAGCGAGCTGTTGCTGAAGATGAACCCGGTATACAAGAAGATCCCGGTTTTATTACAAACGGCAACCAATCTGTGAGTCCCTTA
TCATCGTCCAGTACATTGATGAGGTATGGGGAGACAGATCCCACTGCTGCCGTCTGATCCTTACGAGAGAGCTCAAGCCAGGTTTT
GGGCTGATTTATTGATAAGAAGTTTACGAAGCTTCCAAGGGGCTCTGGTTCAACAAAGGAGAAGAGCTGGAGGCAGCAAGAA
AGACTTCTTGAAGCCCTCAAGACACTGGAGGGAGAGCTCGATCACAAGCCTTACTTCGGGGGTGAAAATTTGGGTTTGTGGATC
TAGCTCTCATCACCTTCTATAATTGTTCTACTTCTACGACACCATCGGCAAAATTCAGTATAGAAGTCGAGTGCCCAAGATCATGC
AGTGGGGAAGAAGGTGCTTGAAGAGAGTCTGTTGCCAAGACCTTCTCTGACACGAAGAAGCTTTCGAGGGCTGCTTTGGAGCT
GCGGAAGAAGATTGGCATGGAGTAGAGTCGAAAGTGGAAGTCATTTGGGTAACCTTGTTGACGTGTCTATGCCCTTTCTTCTCTTCT
CTACCATTTTCTTTTGGTTTTCTTTGGCACTGGGTTATGGCAGGAGAGCGTCTGTTGTATGGTATGCTTTCAAGAATAAGGACACAT
CGTTGTGTCCACTAAGATTTGTCTGTGNTGATGNTTCTAAGCTTTGACGTTGNGAAATATTAAGTTCGCTTGNTCATCTGAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAANNNCTCTGNGTTGANCCNCTGCTTGNCNATANNNGNCCNATANATCTTTCNANANANNCNC
```

Figura III.1 – Sequência completa dos cDNAs *CgChi3* (painel superior) e *CgGst* (painel inferior). A negrito encontram-se identificadas as regiões codificadoras das proteínas (ORF), que começam em ATG (metionina) e terminam no codão stop (TAA) e (TAG), respectivamente.

A escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos na sequência do gene de interesse (Figura III.2) e na sua compatibilidade com o *polylinker* do vetor de clonagem e dos vetores de expressão (Figura II.1 do Capítulo II). Assim, foram selecionadas

as enzimas *Nde* I e *Sal* I.

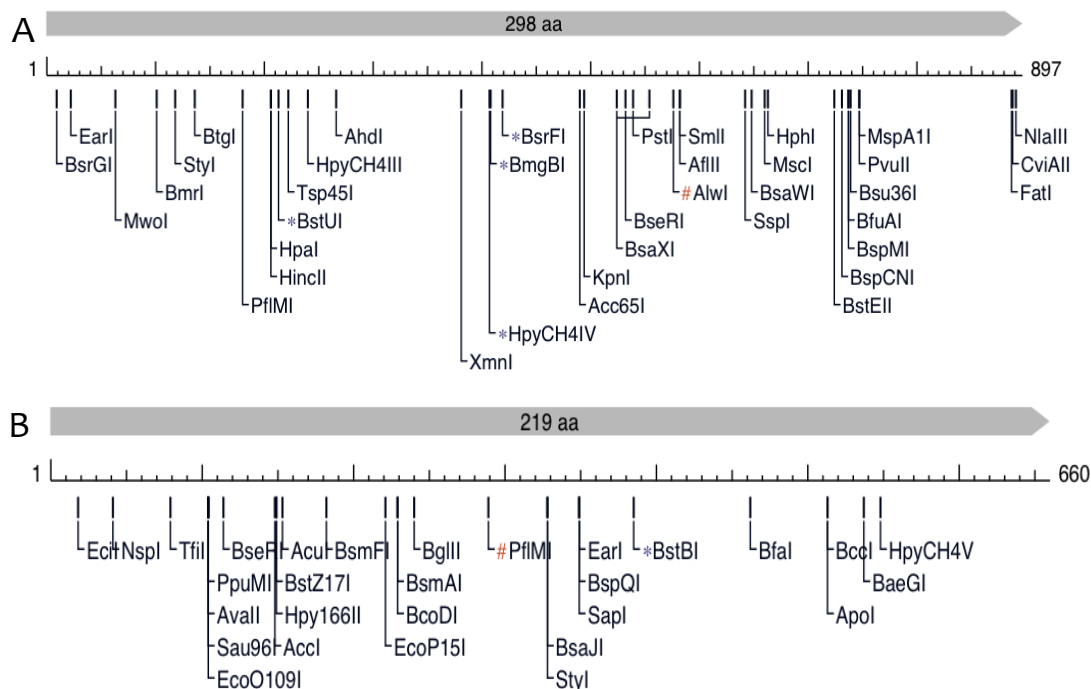


Figura III.2 – Mapa de restrição dos genes *CgChi3* (A) e *CgGst* (B) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

A enzima *Nde* I (CA/TATG) foi incluída no oligonucleótido iniciador da cadeia codificante (*CgChi3*ORFSR_fwd e *CgGst*ORFSR_fwd) e a enzima *Sal* I (G/TCGAC) foi incluída no oligonucleótido iniciador da cadeia anticodificante (*CgChi3*ORFSR_rev e *CgGst*ORFSR_rev) (Figura III.3 e Tabela III.1). Para alinhar a fase de leitura na tradução dos genes, foram incluídos nucleótidos não específicos entre os sítios de restrição e os codões de iniciação.

5' ccatcatATGGCATTGTTGTACAACCTCTTCC 3'
 5' ATGGCATTGTTGTACAACCTCTTCCGATGCTTTCTTTCTTAGGGATGCTAATGCTTGC
 AACAAAGAGCAAATGCTGGTGGAAATGCAATCTACTGGGGTCAAAATGGAAATGAAGGCACCTTGGCAGAGACTT
 GTGCCACGGGTAACTACAACCTTTGTGATCATTGCTTTCTTACCAACTTTTGGGAATGGTCAAACCTCCAATGGTT
 AACCTCGCGGGTCATTGTGACCCTTATAGTAACGGTTGCACCAATTTAAGCTCTGACATAAAGTCGTGTCAAGC
 CAAAGGCATCAAAGTCATCCTTTCTCTTGGGGGTGGGGCTGGAAGTTACTATCTTTCGTCTCTAAGGATGCCA
 AGCAAGTCGCCACTTACCTCTGGAATAACTTCTTAGGGGGACAATCATCTTCACGTCCATTGACCGGCTGTT
 TTAGACGGAAATTGATTTTGACATTGAAGGGGGACGAACAAACATTGGAACGAACCTGCAAGGTACCTTTCAGG
 ATATAGCAAGCAAGGGGAAAAGGTTTACCTAACTGCAGCTCCTCAATGTCCGTTTCCCGATGCTTGGATCGGAA
 ATGCCCTTAAGACTGGTCTTTTGTGATGCGTATGGGTCAATTCTATAACAATCCCCCTTGCCAATATTCCTCC
 GGTGATATGGCCAATCTTGAAGATGCGTGAAGCAATGGACCTCGGACATCCCCGCAAACAAGATTTTCTTGGG
 GTTACCTGCATCTCTGAGGCAGCTGGAAGTGGTTATATCTCTGTCTCTGACCTTACTTCTAAAGTGCTTCCGG
 CCATTAAGGGTTCTGCCAAGTATGGAGGTGTGATGTTGTGGTCCAAGTATTATGATGATCAGAGTGGCTATAGC
 TCTGCCATTAAGGGCCATGTCTAA 3'
 3' GGTAATCCCGGTACAGCAGcagctgtacc 5'

5' ccatcatATGGCGGACGAAGTGGTTCT 3'
 5' ATGGCGGACGAAGTGGTTCTCCTGGATATGTGGATG
 AGCATGTTTGGGATGAGGGTGGAGCTTGTCTGATTGAAAAGGGAATCCAGTACGAGTACAAGGAGGAGGACCT
 GATGAACAAAAGCGAGCTGTTGCTGAAGATGAACCCGGTATACAAGAAGATCCCGGTTTTATTCAACGGCA
 AACCAATCTGTGAGTCCCTTATCATCGTCCAGTACATTGATGAGGTATGGGGAGACAGATCTCCACTGCTGCCG
 TCTGATCCTTACGAGAGAGCTCAAGCCAGGTTTTGGGCTGATTTATTGATAAGAAGTTTACGAAGCTTCCAA
 GGGGCTCTGGTTCAACAAAGGAGAAGAGCTGGAGGCAGCAAGAAAGACTTCTTCGAAGCCCTCAAGACACTGG
 AGGGAGAGCTCGATCACAAGCCTTACTTCGGGGGTGAAAACCTTGGGTTTGTGGATCTAGCTCTCATCACCTTC
 TATAATTGGTTCTACTTCTACGACACCATCGGCAAAATTCAGTATAGAAGTCGAGTGCCCCAAGATCATGCAGTG
 GGGAAGAAGGTGCTTGAAGAGAGTCTGTTGCCAAGACCCTTCTGACACGAAGAAGCTTTGCGAGGCTGCTT
 TGGAGCTGCGGAAGAAGATTGGCATGGAGTAG 3'
 3' CTTCTAACCGTACCTCATcagctctacc 5'

Figura III.3 – Sequência da região codificante (ORF) dos genes *CgChi3* (painel superior) e *CgGst* (painel inferior) e sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados na amplificação dos mesmos (*CgChi3*ORFSR_Fwd e *CgChi3*ORFSR_Rev e *CgGst* ORFSR_Fwd e *CgGst* ORFSR_Rev, respetivamente). Nos oligonucleótidos iniciadores, as bases escritas em minúsculas representam a sequência de DNA que foi introduzida, contendo as sequências de reconhecimento das endonucleases de restrição escolhidas: vermelho para a *Nde* I e azul para a *Sal* I.

Tabela III.1 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificação dos cDNA-ORF dos genes *CgChi3* e *CgGst*.

Nome	T _{fusão} (°C)	Sequência
<i>CgChi3</i> ORFSR_fwd	84	5' – CCATCATATGGCATTGTTGTACAACCTCTTCC – 3'
<i>CgChi3</i> ORFSR_rev	84	5' – CCATGTCGACGACATGGCCCTTAATGG – 3'
<i>CgGst</i> ORFSR_fwd	82	5' – CCATCATATGGCGGACGAAGTGGTTCT – 3'
<i>CgGst</i> ORFSR_rev	84	5' – CCATGTCGACTACTCCATGCCAATCTTC – 3'

III.2 – Amplificação da região codificante dos genes *CgChi3* e *CgGst*

Para cada um dos genes, foram testadas várias condições de amplificação. Na Tabela III.2 encontram-se as condições ótimas para cada um deles.

Tabela III.2 – Condições da PCR otimizadas para amplificação dos genes *CgChi3* e *CgGst*.

Oligonucleótidos iniciadores	T _{hibridação} (°C)	Nº ciclos	cDNA (µg)	gDNA (µg)	MgCl ₂ (mM)	Fragmento de DNA esperado (bp)
<i>CgChi3</i> _Fwd/Rev (50 ng)	50	35	-----	0,45	3	897
<i>CgGst</i> _Fwd/Rev (50 ng)	60	35	0,5	-----	1,5	660

Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % usando brometo de etídeo para a visualização das bandas (Figura III.4).

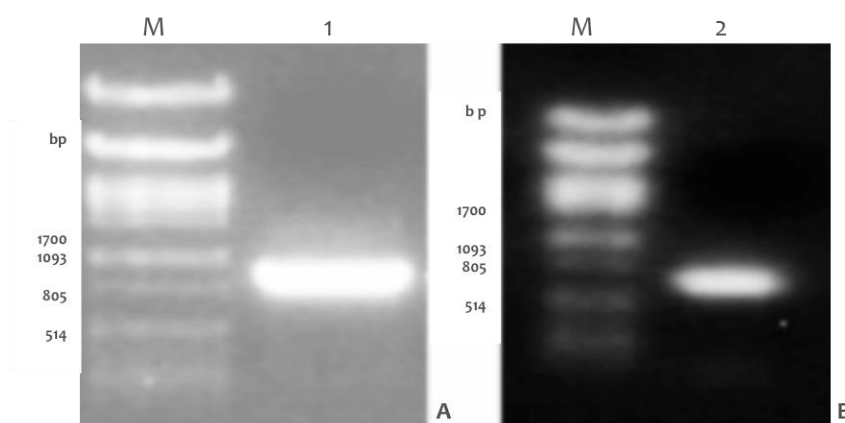


Figura III.4 – Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose (1,2%). M – Marcador de massas moleculares λ PST I; 1 e 2 – Produtos das PCRs (5 µL). (A) corresponde à amplificação do gene *CgChi3* (897 bp) e (B) à do *CgGst* (660 bp). A separação eletroforética decorreu a 86 V durante 30 minutos.

Os fragmentos de cDNA obtidos em A e B têm, de acordo com a Figura III.4, entre 805 e 1093 bp, e 514 e 805, o que está de acordo com o tamanho esperado do gene que codifica a CHI3 e GST de *C. glauca*, 897 e 660 bp, respetivamente.

III.3 – Clonagem dos produtos da PCR

Após a ligação do produto da PCR ao vetor de clonagem e transformação em *Escherichia coli* DH5 α , a seleção dos clones positivos foi realizada por PCR em 6 colónias (cPCR), usando as condições anteriormente descritas (Tabela III.2). Este vetor de clonagem contém o gene para uma enzima de restrição que é letal para todas as estirpes de *E. coli* geralmente utilizadas em clonagem. A ligação de um fragmento de DNA no sítio de clonagem interrompe este gene. Como resultado, só as células com os plasmídeos recombinantes crescem. Os resultados da cPCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1,2 % corado com brometo de etídeo (Figura III.5).

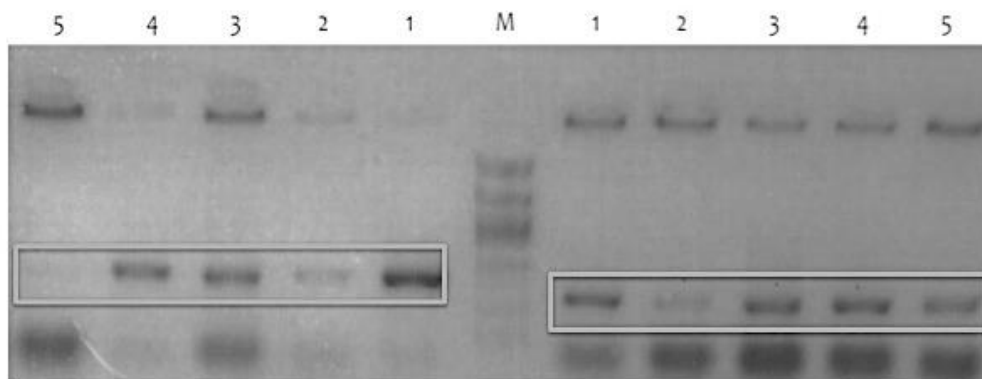


Figura III.5 – Verificação da reação de ligação dos produtos da PCR ao vetor de clonagem pJET1.2 após cPCR, por eletroforese em gel de agarose (1,2 %). M – Marcador de massas moleculares λ PST I; Os números do lado esquerdo do marcador correspondem à amplificação de *CgChi3* (897 bp) e do lado direito de *CgGst* (660 bp). A separação eletroforética decorreu a 86 V durante 30 minutos.

Após sequenciação dos plasmídeos recombinantes e comparação das sequências de nucleótidos com a sequência original de ambos os genes, para efeitos de confirmação, procedeu-se à sub-clonagem nos vetores de expressão pET-21c e pET-28b.

III.3.1 – Subclonagem de *CgChi3* e *CgGst* nos vetores de expressão pET-28b e pET-21c

O padrão da reação de hidrólise dos plasmídeos recombinantes (pJET1.2-*Cgchi3* e pJET1.2-*CgGst*) e dos vetores expressão (pET-21c e pET-28b) pelas endonucleases de restrição *Nde* I e *Sal* I foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % com brometo

de etídeo (Figura III.6).

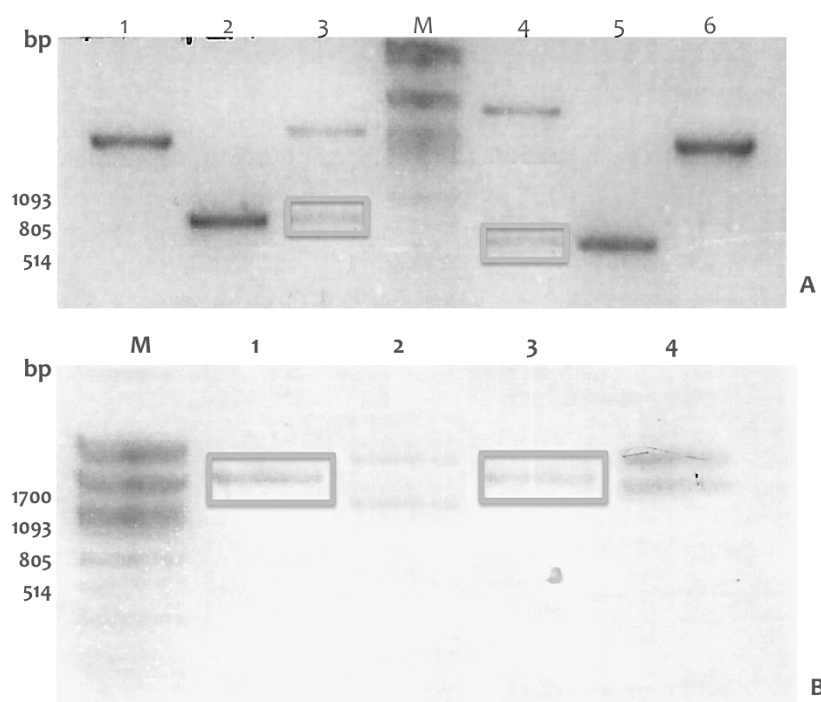


Figura III.6 – Verificação da reação de hidrólise dos plasmídeos recombinantes e dos vetores de expressão pelas endonucleases de restrição *Nde* I e *Sal* I, por eletroforese em gel de agarose (1,2 %). M – Marcador de massas moleculares λ PST I; (A) 1 – pJET1.2-Cgchi3; 2 – Produto da PCR (amplificação do gene CgChi3); 3 – pJET1.2-CgChi3 hidrolisado com *Sal* I e *Nde* I; 4 – pJET1.2- CgGst hidrolisado com *Sal* I e *Nde* I; 5 – Produto da PCR (amplificação do gene CgGst); 6 – pJET1.2-CgGst; (B) 1 – pET-21c hidrolisado com *Sal* I e *Nde* I; 2 – pET-21c; 3 – pET-28b hidrolisado com *Sal* I e *Nde* I; 4 – pET-28b.

Como se pode verificar na Figura III.6, os vetores foram linearizados, produzindo fragmentos de tamanho esperado, 897 bp (CgChi3), 660 bp (CgGst), 2974 bp (pJET1.2), 5384 bp (pET-21c) e 5310 bp (pET-28b). Após a purificação dos fragmentos de DNA, CgChi3 e CgGst, duplamente hidrolisados, procedeu-se à ligação destes aos vetores de expressão, igualmente linearizados e purificados, e subsequente transformação em *E. coli* DH5 α . Foi posteriormente realizado uma PCR em 4 colónias transformadas e isolados e sequenciados os respetivos DNA plasmídicos com o objetivo de reconfirmar a sequência dos insertos. Os vetores de expressão contendo os genes de interesse são apresentados na Figura III.7.

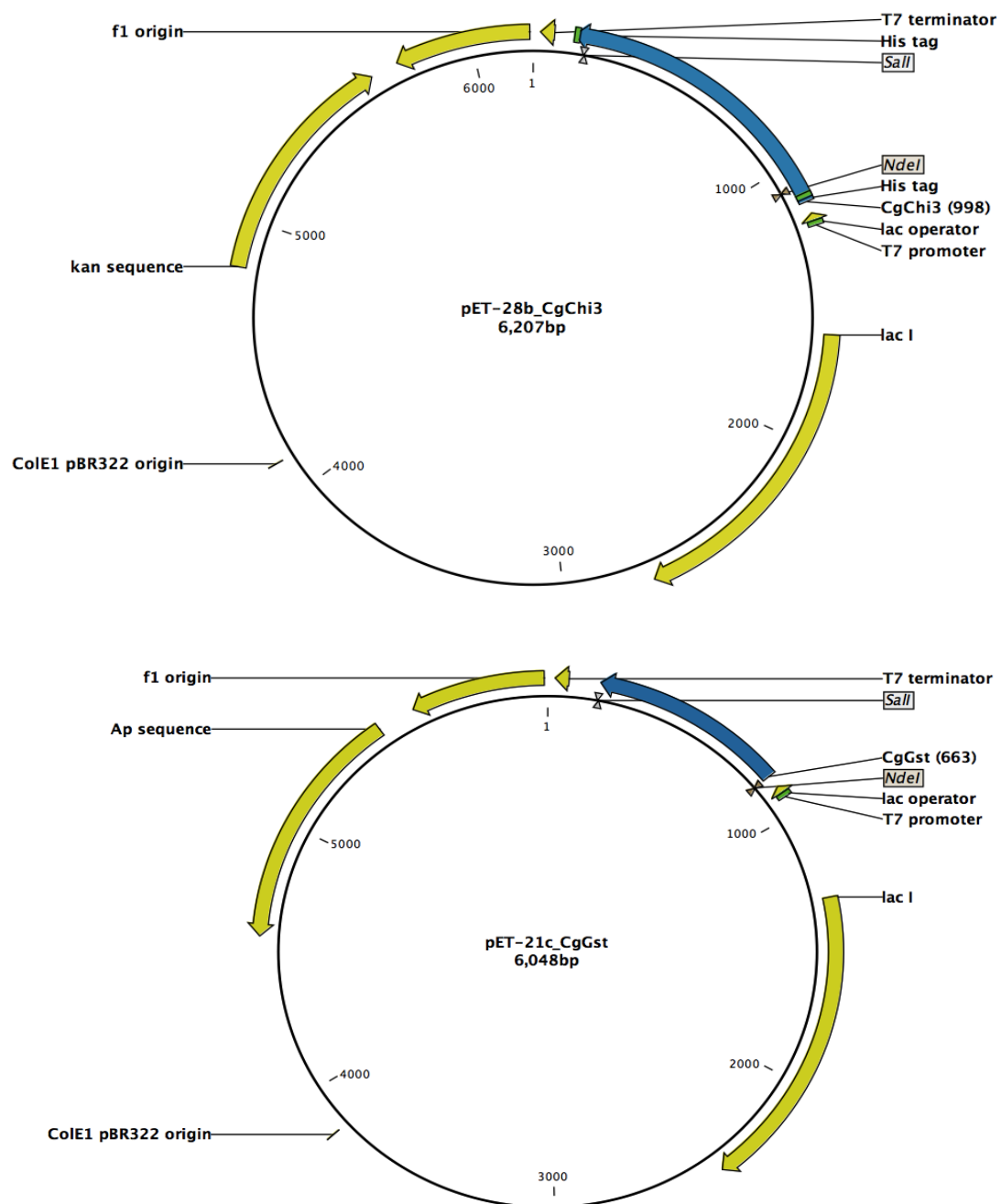


Figura III.7 – Mapa dos vetores de expressão construídos para produção de CgCHI3 e CgGST em *E. coli*.

III.4 – Produção das proteínas recombinantes

III.4.1 – Otimização das condições de expressão

A sobre-expressão dos genes *Cghi3* e *CgGst* em células *E. coli* BL21 (DE3) foi analisada por SDS-PAGE (Figura III.8), confirmando-se a produção das proteínas recombinantes, a avaliar pela presença de bandas de proteína com massas moleculares aparentes esperadas, respetivamente 32 kDa e 26 kDa. Assim, para cada uma das proteínas recombinantes, foram definidas as condições ótimas de sobre-expressão descritas na Tabela III.3.

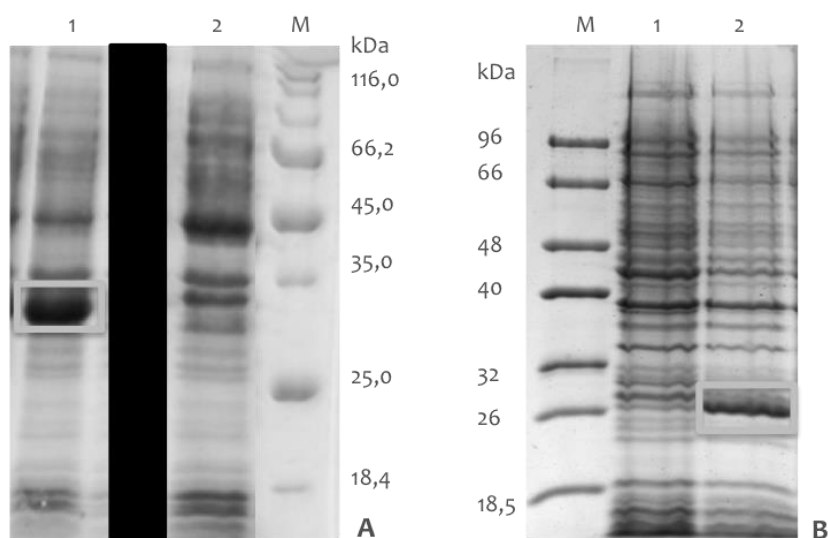


Figura III.8 – Análise da sobre-expressão das proteínas recombinantes CgCHI3 (A) e CgGST (B) em células de *E. coli* BL21 (DE3), por SDS-PAGE. Gel A: 1 – Perfil proteico após indução do pET- 28b-CgCHI3 durante 3 h com 0,1 mM de IPTG; 2 – Perfil proteico das células de *E. coli* BL21 (DE3) com pET-28b-CgCHI3, na ausência de indutor após 3 h. Gel B: 1 – Perfil proteico das células de *E. coli* BL21 (DE3) com pET21c-CgGST, na ausência de indutor após 3 h; 2 – Perfil proteico após indução do pET21c-CgGST durante 3 h com 0,5 mM de IPTG. M corresponde ao marcador de massas moleculares, LMW-SDS Marker, GE Healthcare Life Sciences no gel A e LMW, NZYTech em B. Os retângulos indicam a posição das bandas correspondentes às proteínas CgCHI3 e CgGST.

Tabela III.3 – Condições ótimas de sobre-expressão das proteínas recombinantes CgCHI3 e CgGST em células *E. coli* BL21 (DE3).

Proteína recombinante	OD _{600 nm} na altura da indução	[IPTG] (mM)	Tempo de indução (h)	Temperatura (°C)
CgCHI3	0,5-0,6	0,1	3	37
CgGST	0,5-0,6	0,5	3	37

III.4.2 – Produção em grande escala das proteínas recombinantes

Otimizadas as condições de sobre-expressão, seguiu-se o aumento do volume do meio de cultura para 1 l, de modo a obter proteína em quantidade suficiente para posterior purificação e caracterização. Todos os passos do procedimento para obtenção do extrato proteico estão descritos no Capítulo II e foram monitorizados através de SDS-PAGE 12,5 % em acrilamida (Figura III.9).

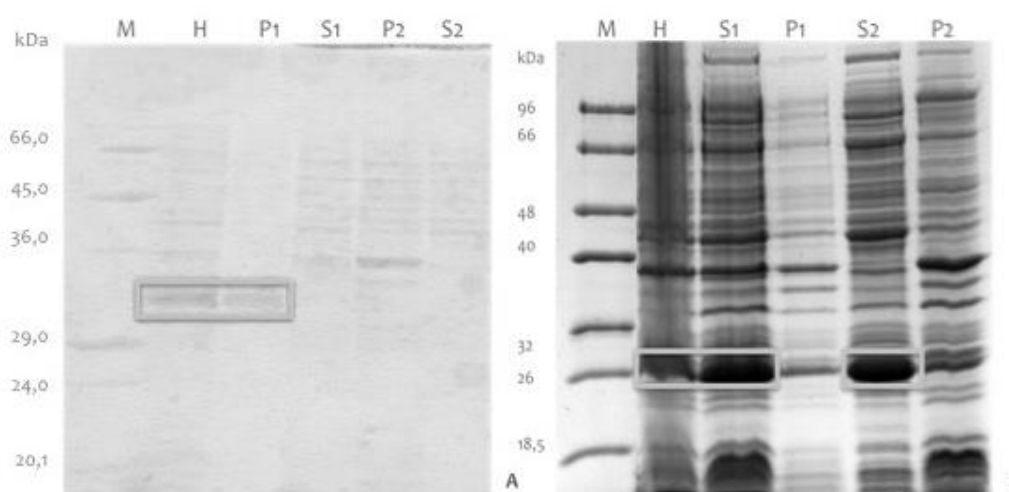


Figura III.9 – Monitorização, por SDS-PAGE (12,5 % em acrilamida), da produção em larga escala das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21 (DE3) a 37 °C. **Gel A:** H – Extrato proteico de CgCHI3 após lise celular; P1 – suspensão do sedimento após centrifugação a baixa velocidade; S1 – sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; P2 – fração membrana obtida por ultracentrifugação e S2 – fração solúvel após ultracentrifugação. **Gel B:** H – Extrato proteico de CgGST após lise celular; S1 – sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; P1 – suspensão do sedimento após centrifugação a baixa velocidade; S2 – fração solúvel após ultracentrifugação e P2 – fração membrana após ultracentrifugação. No gel A, M representa o marcador de massa molecular LMW Sigma (M3913) e no gel B, o marcador de massa molecular LMW, NZYTech (ver anexo 1). Os retângulos indicam a posição das bandas de CHI3 e GST.

Tal como se havia observado anteriormente, a SDS-PAGE mostra uma banda intensa à volta de 26 kDa que corresponde à GST de *C. glauca* produzida em *E. coli* (gel B, poço H da Figura III.9). Após fracionamento celular concluiu-se que a proteína está a ser produzida na forma solúvel, sendo detetada nos sobrenadantes, quer da centrifugação a baixa velocidade (S1), quer da ultracentrifugação (S2). No entanto, a banda mais intensa da CgCHI3 (gel A da Figura III.9), apenas foi observada no homogeneizado celular (H) e no sedimento resultante da centrifugação a baixa velocidade (P1), o que indica que a proteína recombinante não foi produzida na forma solúvel, mas sim em agregados designados por

corpos de inclusão. Com o objetivo de aumentar a taxa de produção de CgCHI3 na forma solúvel testou-se o efeito da temperatura no crescimento celular, mantendo as restantes condições de sobre-expressão estabelecidas anteriormente (Figura III.10).

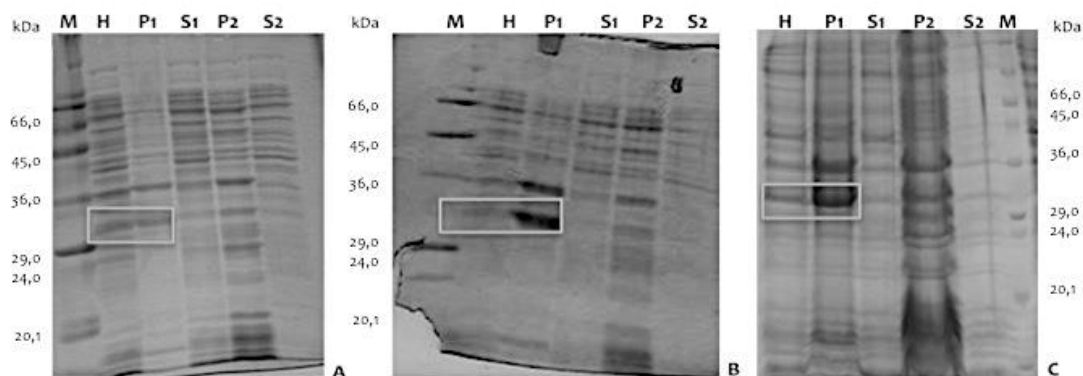


Figura III.10 – Avaliação do efeito da temperatura na produção de CgCHI3 em *E. coli* BL21 (DE3) por SDS-PAGE (12,5 % em acrilamida). Indução da expressão a 26 °C (A), 15 °C (B) e 4 °C (C). Em todos os géis, H representa a amostra do homegeneizado celular; P1 corresponde à suspensão do sedimento da centrifugação a baixa velocidade; S1 é o sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; P2 e S2 correspondem, respetivamente, à suspensão do sedimento e ao sobrenadante da ultracentrifugação (ver fracionamento celular descrito na Figura II.6 do Capítulo II). M representa o marcador de massa molecular LMW Sigma (M3913). Os retângulos indicam a posição das bandas de CHI3.

Os géis da Figura III.10 mostram que embora a diminuição da temperatura de indução melhore ligeiramente a produção de CgCHI3 na forma solúvel, a proteína continua a ser predominantemente produzida na forma de corpos de inclusão, tal como observado nas culturas induzidas a 37 °C. Assim, com o objetivo de se melhorar a eficiência de produção de quitinase na forma solúvel foram testadas duas novas estirpes de *E. Coli*, C41 (DE3) e C43 (DE3), ambas derivadas de *E. coli* BL21 (DE3), eficientes na expressão de proteínas tóxicas e proteínas membranares (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). Os resultados obtidos são apresentados na Figura III.11.

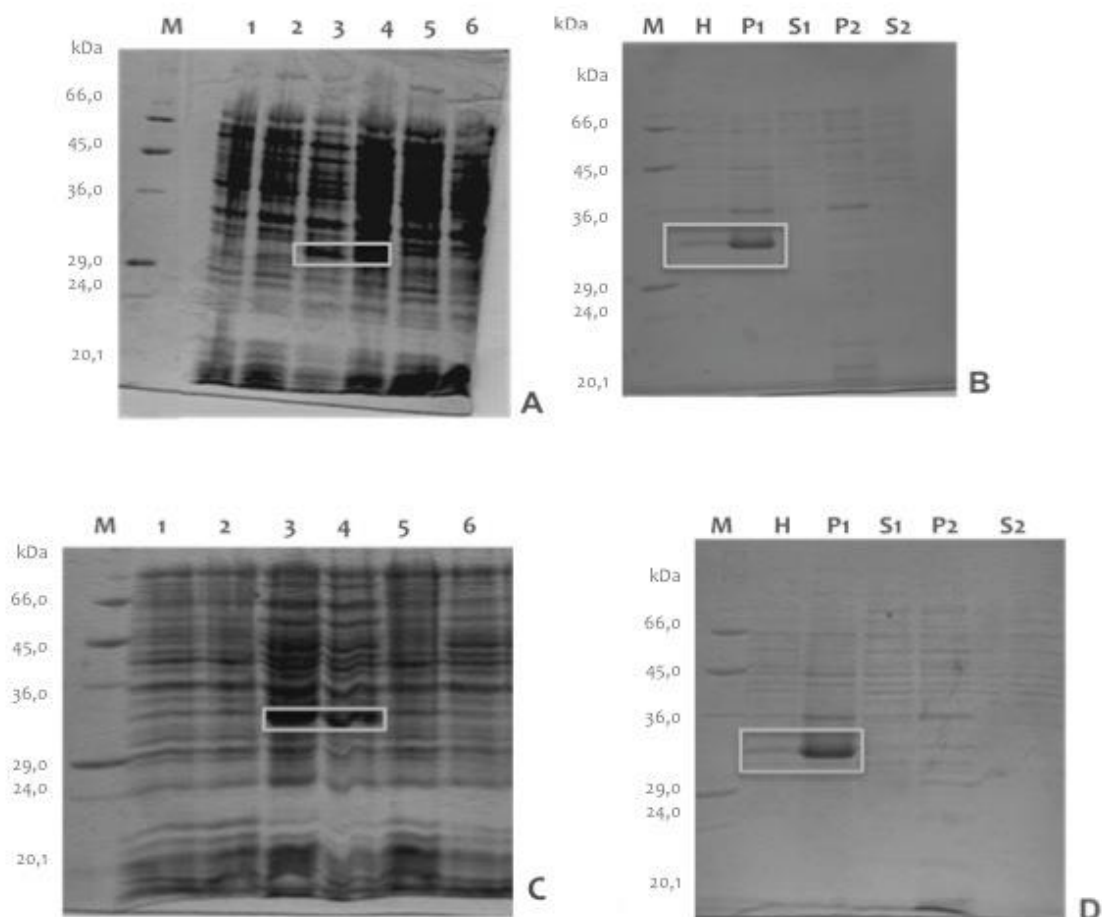


Figura III.11 – Sobre-expressão da CgCHI3 em *E. coli* nas estirpes C41 (DE3) (A e B) e C43 (DE3) (C e D) a 37 °C, por SDS-PAGE (12 % acrilamida), em meio de cultura LB (ver Tabela III.3). **Gel A:** 1 e 2 – Perfil proteico antes e após indução das células *E. coli* C41 (DE3) com pET-28b durante 3 h com 0,1 mM de IPTG, respetivamente; 3 e 4 – após indução das células *E. coli* C41 (DE3) com pET-28b-CgCHI3 durante 3 h com 0,1 mM de IPTG; 5 e 6 – antes da indução das células *E. coli* C41 (DE3) com pET-28b-CgCHI3. **Gel C:** 1 e 2 – Perfil proteico antes e após indução das células *E. coli* C43 (DE3) com pET-28b durante 3 h com 0,1 mM de IPTG; 3 e 4 – após indução das células *E. coli* C43 (DE3) com pET-28b-CgCHI3 durante 3 h com 0,1 mM de IPTG; 5 e 6 – antes da indução das células *E. coli* C43 (DE3) com pET-28b-CgCHI3. Nos **géis B e D**, H representa a amostra do homegeneizado celular; P1 corresponde à suspensão do sedimento da centrifugação a baixa velocidade; S1 é o sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; P2 e S2 correspondem, respetivamente, à suspensão do sedimento e ao sobrenadante da ultracentrifugação (ver fracionamento celular descrito na Figura II.6 do Capítulo II). M representa o marcador de massa molecular LMW Sigma (M3913). Os retângulos indicam a posição das bandas de CHI3.

Da comparação dos resultados obtidos nas diferentes condições de sobre-expressão da CgCHI3 (Figuras III.9-11) conclui-se que em qualquer das condições testadas, a proteína CgCHI3 foi sempre produzida na forma de agregados insolúveis (corpos de inclusão), sendo a taxa de produção na forma solúvel muito reduzida. Parece, no entanto, que na estirpe celular BL21 (DE3) a quantidade produzida é maior. Assim, prosseguiu-se com a sobre-

expressão em *E. coli* BL21 (DE3) a uma temperatura de indução de 15 °C e solubilização e purificação da mesma a partir dos corpos de inclusão. Antes porém, a identidade da proteína recombinante foi confirmada em gel desnaturante de poli-acrilamida a 12,5%, seguido de *Western blotting* com um anticorpo antiquitinase classe III de *Lupinus albus* (tremoceiro) e um anticorpo poli-histidina que reconhece as caudas de afinidade da proteína híbrida (dados não apresentados).

III.5 – Purificação das proteínas recombinantes

III.5.1 – Solubilização de CgCHI3 a partir dos corpos de inclusão

O sedimento obtido após centrifugação a baixa velocidade da suspensão celular foi usado para solubilizar a proteína dos corpos de inclusão. Após lavagem do sedimento, os agregados proteicos foram desnaturados, usando-se 8 M ureia como agente desnaturante. A renaturação da proteína foi efetuada por remoção lenta do agente desnaturante. A adição de um tampão redox à solução desnaturante teve como objetivo manter a proteína na forma monomérica. O processo de solubilização e renaturação da proteína dos corpos de inclusão foi verificado por SDS-PAGE, tal como se pode observar na Figura III.12.

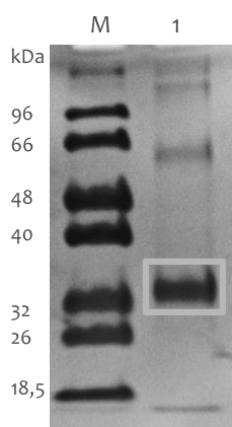


Figura III.12 – Verificação do processo de solubilização dos corpos de inclusão por SDS-PAGE a 12,5 % em acrilamida. M - marcador de massa molecular LMW NZYTech e 1 – Solução que contém CgCHI3 obtida após renaturação dos corpos de inclusão. O retângulo indica a posição da banda correspondente a CHI3.

III.5.2 – Purificação da CgCHI3 a partir da solubilização dos corpos de inclusão

O dialisado final obtido do processo de solubilização dos corpos de inclusão foi filtrado e aplicado numa coluna de afinidade “HisTrap™ FF Columns” de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) previamente equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,8 contendo 5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM 0,1 % Tween e 20 mM imidazol. A eluição das proteínas adsorvidas à matriz cromatográfica foi efetuada com o aumento da concentração de imidazol para 500 mM no tampão de equilíbrio (ver Tabela II.11 do Capítulo II). O cromatograma obtido e o gel SDS-PAGE usado para analisar a pureza das frações recolhidas, é apresentado na Figura III.13.

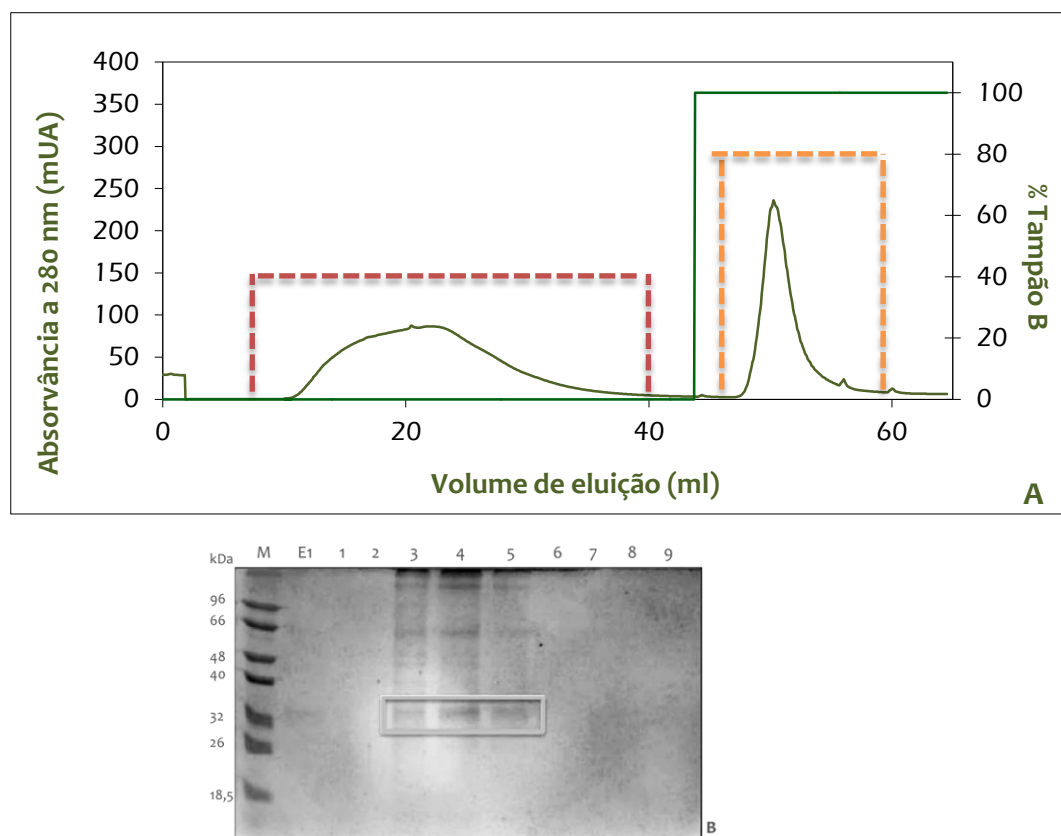


Figura III.13 – (A) Perfil cromatográfico da purificação da CgCHI3 sobre-expressa em *E. coli* BL21 (DE3) a partir da solubilização dos corpos de inclusão, na coluna de afinidade “HisTrap™ FF Columns” de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences). As frações I (---) e II (---) correspondem, respetivamente, à fração recolhida no passo de lavagem da coluna e à fração obtida durante o passo de eluição com tampão B (50 mM Tris-HCl pH 7,8 contendo 5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM 0,1 % Tween e 500 mM imidazol). Usou-se um caudal de 1 ml/min e recolheram-se frações de 1 ml. (B) Análise das frações obtidas no passo de purificação da CgCHI3 por SDS-PAGE 12,5 % em acrilamida. M – NZYtech LMW; E1 – fração I; 1 a 9 – frações obtidas no passo de eluição com tampão B. O retângulo indica a posição das bandas de CHI3.

Como se pode concluir da análise do gel da Figura III.13, na fração resultante da lavagem da coluna (Fração I, poço E1) observa-se uma banda muito ténue podendo considerar-se que praticamente não contém a proteína CgCHI3. Verifica-se também que as frações aplicadas nos poços 3 a 5 são as mais ricas em CgCHI3, com uma banda mais intensa de massa molecular aparente de cerca de 32 kDa (Fração II). A presença de bandas de massa molecular mais elevadas nestas frações (uma com massa molecular aparente aproximadamente igual a 66 kDa) correspondem a formas multiméricas da enzima que não desnaturam totalmente nas condições do SDS-PAGE (Staufenberger *et al.*, 2012), considerando-se assim a proteína pura. A comparação dos géis da fração purificada por cromatografia de afinidade com o gel da fração obtida após solubilização dos corpos de inclusão revela um perfil electroforético muito semelhante, com a banda da CgCHI3 muito mais intensa na última, tendo-se por esta razão optado por estudar a proteína obtida por aquele processo.

III.5.3 – Purificação da CgGST a partir da fração solúvel

O método de purificação da GST foi baseado na elevada afinidade desta enzima pela glutationa. Assim, após remoção das impurezas por lavagem com tampão de ligação, as proteínas ligadas à glutationa, são eluídas em condições não-desnaturantes. Desta forma usou-se uma coluna de afinidade GSTrap HP 5 ml (GE Healthcare life Sciences) equilibrada com tampão de ligação PBS, pH 7,3 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3). A proteína adsorvida foi eluída com tampão de eluição 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 10 mM glutationa reduzida. Foram recolhidas duas frações da coluna: E1 que corresponde à fração recolhida no passo de lavagem e que contém o que não foi adsorvido à matriz cromatográfica e E2 que corresponde à fração obtida no passo de eluição e que contém a proteína pura (Figura III.14).

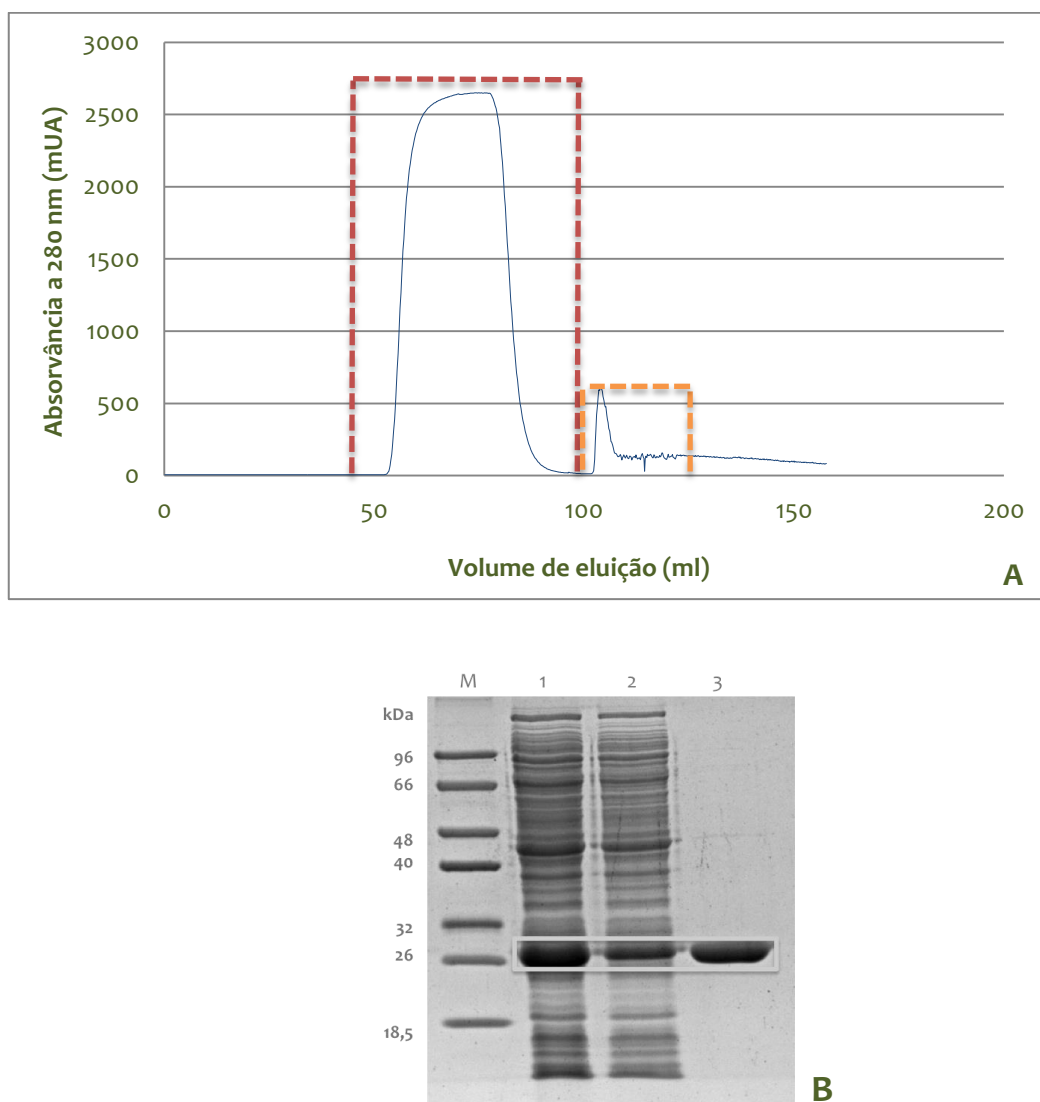


Figura III.14 – (A) Perfil cromatográfico da purificação da CgGST sobre-expressa em *E. coli* BL21 (DE3), na coluna de afinidade GSTrap HP 5 ml (GE Healthcare Life Sciences). As frações E1 (---) e E2 (---) correspondem, respetivamente, à fração não adsorvida à matriz cromatográfica e à fração recolhida durante a eluição das proteínas adsorvidas. Usou-se um caudal de 5 ml/min e recolheram-se frações de 5 ml. (B) Análise das frações obtidas na purificação da GST de *C. glauca* em *E. coli* por SDS-PAGE 12,5 % em acrilamida. M – NZYtech LMW; 1 – amostra aplicada na coluna; 2 – fração E1 e 3 – fração E2. O retângulo indica a posição das bandas de GST.

Do gel SDS-PAGE da Figura III.14, observa-se uma única banda electroforética com massa molecular aparente de 26 kDa na fração recolhida no passo de eluição (E2), podendo considerar-se que a proteína CgGST está pura. Na fração E1 é visível uma banda de intensidade considerável, mas muito inferior à da fração E2, com massa molecular aparente idêntica à da GST que é explicada pela saturação da coluna cromatográfica.

III.6 – Caracterização das proteínas recombinantes

III.6.1 – Propriedades bioquímicas

Os parâmetros apresentados na Tabela III.4 foram determinados com base na sequência de aminoácidos da CgCHI3 e da CgGST pelo programa “ExPASy ProtParam tool” (Gasteiger *et al.*, 2003). Outros parâmetros identificados para cada uma das proteínas, incluem os domínios da proteína, famílias e sítios funcionais (Prosite scan), bem como a sua localização subcelular (WoLF PSORT). Estes dados são apresentados no capítulo da discussão.

Tabela III.4 - Parâmetros teóricos característicos da CgCHI3 e CgGST determinados através do programa “ExPASy ProtParam tool”.

Propriedade	CgCHI3	CgCHI3 Híbrida	CgGST
Massa molecular (Da)	31921,1	35467,05	25753,95
pI teórico	6,79	7,66	5,34
Coeficiente de extinção molar a 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$)	68340	68340	46660

III.6.2 – Sequenciação da região N-terminal da CgCHI3 por degradação de Edman

Devido à presença de mais do que uma banda electroforética no gel SDS-PAGE da fração purificada por cromatografia de afinidade (Figura III.13), foi determinada a sequência de aminoácidos da região N-terminal da banda com massa molecular aparente aproximadamente igual a 32 kDa correspondente à CgCHI3. Obteve-se a sequência de aminoácidos dos 5 primeiros resíduos: G-S-S-H-H. A comparação da sequência obtida com a sequência deduzida a partir do fragmento de DNA clonado (Figura III.15) mostra que a sequência da região N-terminal é coincidente, o que indica que a proteína purificada corresponde a CgCHI3.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSMAFCTTLPMSFLFLGMLMLATRANAGGIAIYWQNGNEGTLA
ETCATGNYNFVIIAFLPTFGNGQTPMVNLAGHCDPYSNGCTNLSSDIKSCQAKGIKVLISL
GGGAGSYLSSSKDAKQVATYLVNNFLGGQSSSRPFGPAVLGDIDFDIEGGTNKHWNELAR
YLSGYSKQGKKVYLTAAPQCPFPDAWIGNALKTGLFDCVWVQFYNNPPCQYSSGDMANLED
AWKQWTS DIPANKIFLGLPASPEAAGSGYIPVSDLTSKVLPAIKGSAKYGGVMLWSKYDD
QSGYSSAIKGHV**KLAAALEHHHHH**

Figura III.15 – Sequência de aminoácidos da CgCHI3 recombinante deduzida a partir da sequência de nucleótidos da proteína híbrida, incluindo as duas caudas de histidinas inseridas por clonagem do gene no vetor pET-28b, uma na região N-terminal e outra na região C-terminal, representadas a negrito. A Encarnado está representada a sequência da região N-terminal determinada por degradação de Edman.

III.6.3 – Quantificação das proteínas CgCHI3 e CgGST

A concentração das proteínas recombinantes puras foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA). Para cada determinação de proteína construiu-se uma reta de calibração com albumina do soro bovino (BSA) a partir da qual se determinou a quantidade de proteína. A Figura III.16 mostra uma reta de calibração representativa. Após purificação das duas proteínas em estudo e seguindo o protocolo descrito obtiveram-se preparações com $1,0 \pm 0,2$ mg/ml de CgCHI3 e com $0,8 \pm 0,2$ mg/ml de CgGST.

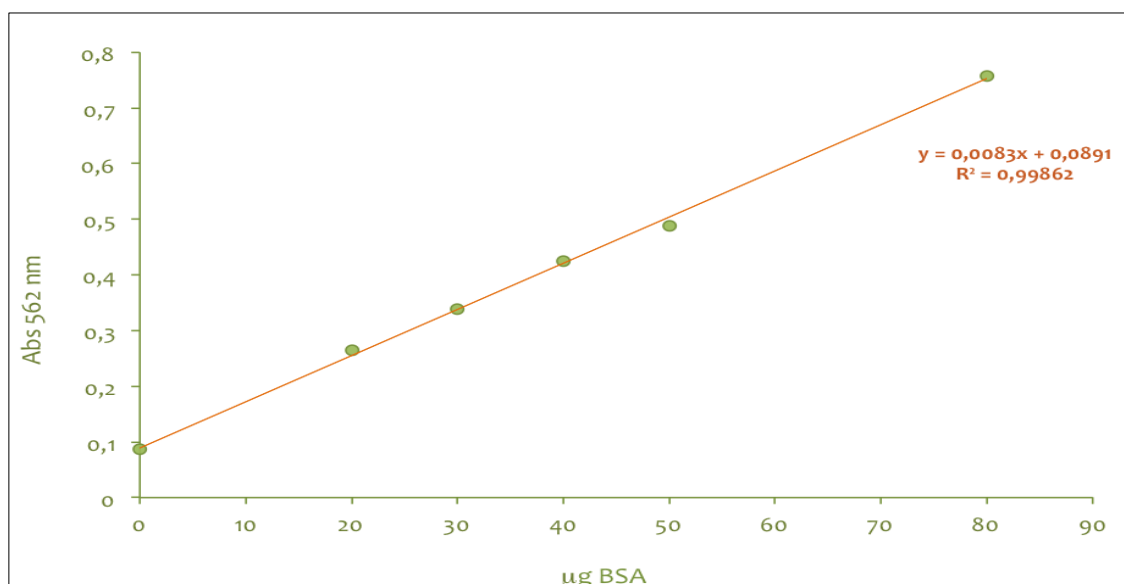


Figura III.16 – Reta de calibração para a quantificação de proteína total pelo método do BCA com BSA como padrão (1 mg/ml). Cada ponto representa a média de três replicados.

III.6.4 – Análise funcional das proteínas recombinantes

III.6.4.1 – Atividade quitinolítica da CgCHI3

A atividade quitinolítica da CgCHI3 foi avaliada medindo a libertação de sacáridos redutores do substrato CM-Chitin-RBV, um polímero de quitina solúvel. Na Figura III.17 está representada a variação da absorvância, proporcional à concentração do produto da reação quitinolítica, em função do tempo.

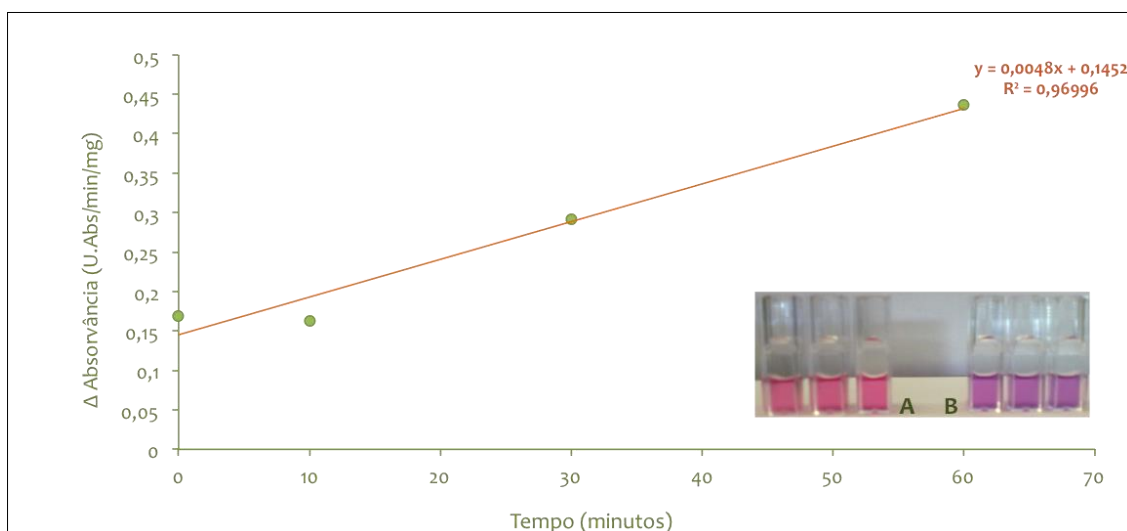


Figura III.17 – Atividade quitinolítica de CgCHI3 usando CM-Chitin-RVB como substrato, a pH 5,4 e 37 oC. A inserção mostra a comparação dos ensaios na presença de enzima (B) e na sua ausência (A). Cada ponto experimental representa a média de três replicados.

A partir do gráfico da Figura III.17 calculou-se a atividade específica para o substrato CM-Chitin-RBV (atividade de endoquitinase) tendo-se obtido um valor igual a $23,5 \pm 4,2$ U.Abs_{550 nm}/min/mg. Paralelamente foram testados outros substratos no sentido de inferir sobre o modo de ação da enzima usando o kit da Sigma “Chitinase Assay”. A atividade de exoquitinase (quitobiosidase), hidrólise de di-acetilquitobiósidos com formação de monómeros de N-acetilglucosamina, foi testada com o substrato 4-nitrofenil N,N'-diacetil-D-quitobiósido, enquanto para a atividade de β-N-acetilglucosaminidase (exoquitinase) se usou o substrato 4-N-nitrofenil 2-acetamido 2-desoxiβ-D-glucopiranosídeo. Em ambos os casos os valores da atividade específica foram residuais, inferiores a 1 % do valor obtido para o controlo positivo fornecido no kit.

III.6.4.2 – Atividade lisozimática da CgCHI3

Tendo em conta que algumas quitinasases isoladas de plantas superiores e de animais são descritas como bifuncionais, apresentando também atividade lisozimática (Patel *et al.*, 2010; Ghasemi *et al.*, 2011), analisou-se a capacidade lisozimática da CgCHI3 em células de *Micrococcus lysodeikticus*, uma bactéria Gram-positiva, determinando-se espectrofotometricamente a taxa de lise celular a pH 7,0. A velocidade de lise, calculada pelo decréscimo da densidade ótica a 450 nm por minuto em função da concentração de CgCHI3 é apresentada no gráfico da Figura III.18, verificando-se linearidade entre a velocidade e a concentração de enzima. Determinou-se uma atividade específica lisozimática da CgCHI3 igual a 115 ± 30 U/mg, considerando 1 unidade de atividade enzimática igual à diminuição de 0,001 unidades de absorvância a 450 nm por minuto.

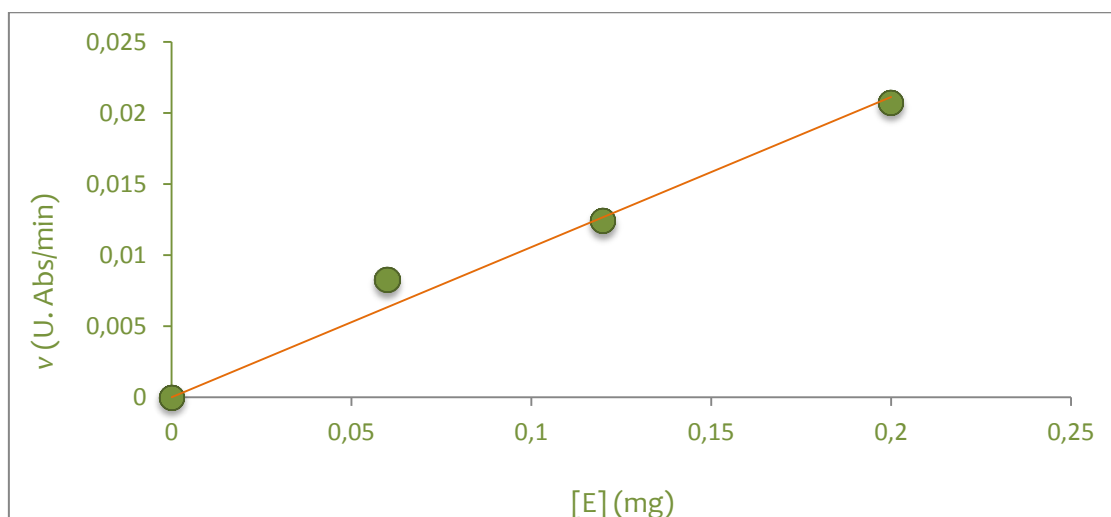


Figura III.18 – Atividade lisozimática da CgCHI3 usando uma cultura celular de *Micrococcus lysodeikticus*. Cada ponto experimental representa a média de três replicados.

III.6.4.3 – Atividade β -1,3-glucanase da CgCHI3

A enzima purificada apresenta ainda atividade de β -1,3-glucanase como é visível na Figura III.19. Com base no gráfico da variação da absorvância a 600 nm em função do tempo determinou-se a atividade específica de β -1,3-endoglucanase da CgCHI3 para o substrato CM-Curdlan-RBB, obtendo-se um valor igual a $0,7 \pm 0,1$ U.Abs_{600 nm}/min/mg.

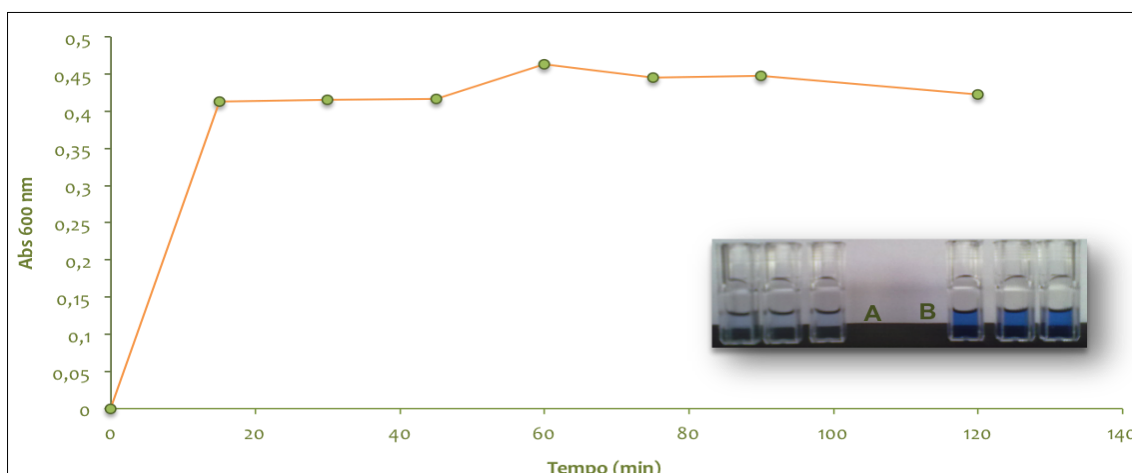


Figura III.19 – Atividade β -1,3-glucanase da CgCHI3 usando CM-Curdlan-RBB como substrato, em tampão 0,2 M acetato a pH 5,4 e a 37 °C. A inserção mostra a comparação dos ensaios na presença de enzima (B) e na sua ausência (A). Cada ponto experimental representa a média de três replicados.

III.6.4.4 – Atividade β -1,4-endoglucanase da CgCHI3

Face aos resultados obtidos, testou-se também a atividade de β -1,4-endoglucanase (carboximetil celulase) usando carboximetil-celulose de sódio, um polímero derivado da celulose solúvel em água. Tal como se pode observar na Figura III.20, a CgCHI3 é ativa para o substrato testado, nas condições em que foi isolada e purificada. A atividade específica é de 194 ± 30 U.Abs_{570 nm}/min/mg.

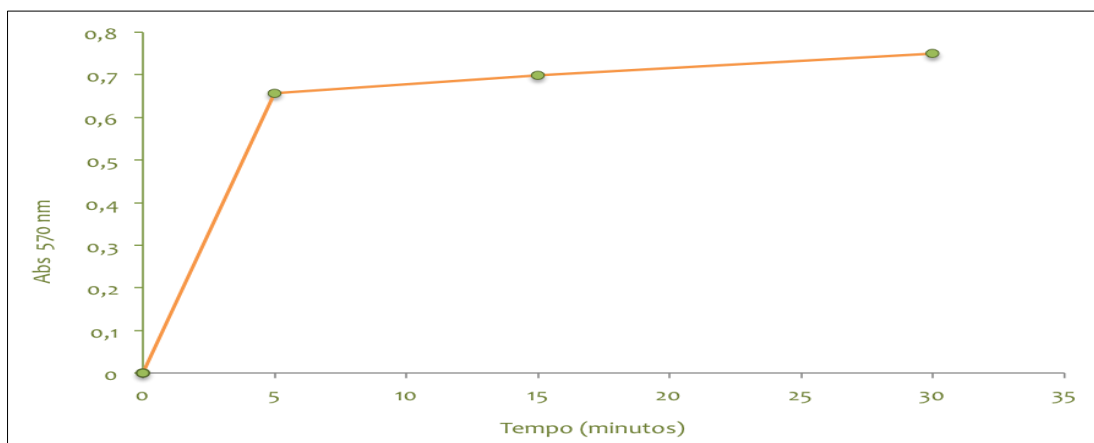


Figura III.20 – Atividade β -1,4-glucanase (carboximetil celulase) da CgCHI3 usando carboximetil celulose a pH 5,2. Cada ponto experimental representa a média de três replicados.

III.6.4.6 – Atividade antifúngica da CgCHI3

Tendo em conta que a grande maioria das quitinasases tem atividade antifúngica, testou-se a atividade da CgCHI3 em alguns dos principais fungos fitopatogénicos (Figura III.21), dois dos quais, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma viride*, altamente susceptíveis ao tratamento com quitinasases. Após 3 dias e durante 1 semana, o crescimento dos mesmos foi observado. As hifas resultantes da suspensão de conídios cresceram para fora a partir do disco central, como um círculo, não tendo sido visualizado qualquer tipo de inibição de crescimento à volta dos discos.

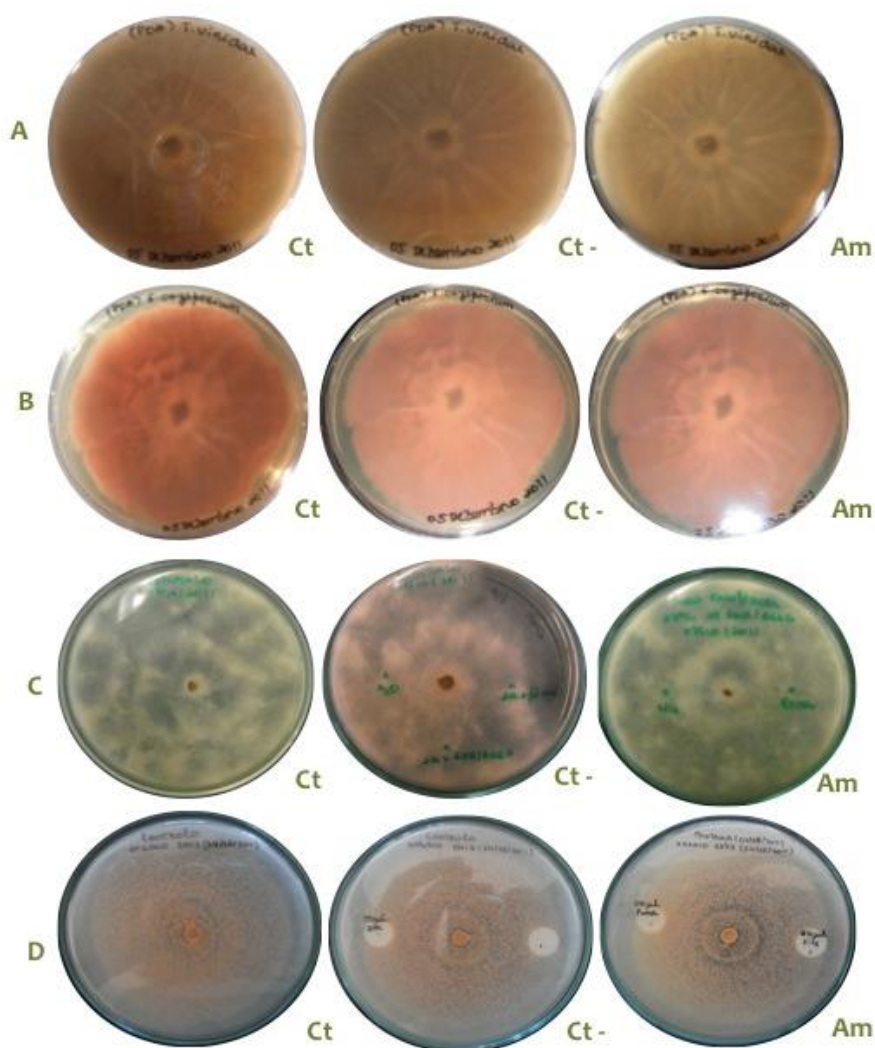


Figura III.21 – Atividade antifúngica da CgCHI3. A, B, C e D correspondem a *Colletotrichum gloeosporioides* (Antracnose da mandioca), *Botrytis cinerea* (Podridão cinzenta da purgueira), *Trichoderma viride* (Tomateiro) e *Fusarium oxysporum* (Murcha de fusário do tomateiro) respetivamente. Ct, Ct+ e Am correspondem ao fungo sem tratamento, à incubação com água e tampão DR e incubação com a enzima em estudo, respetivamente.

III.6.4.7 – Atividade antibacteriana da CgCHI3

Os testes antibacterianos foram realizados com algumas bactérias não-simbióticas (Figura III.22) e após 24 horas de incubação a 37 °C, o crescimento dos mesmos foi observado. Os resultados aqui apresentados demonstram que todas as estirpes bacterianas testadas são sensíveis à enzima. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com a concentração da enzima em estudo.

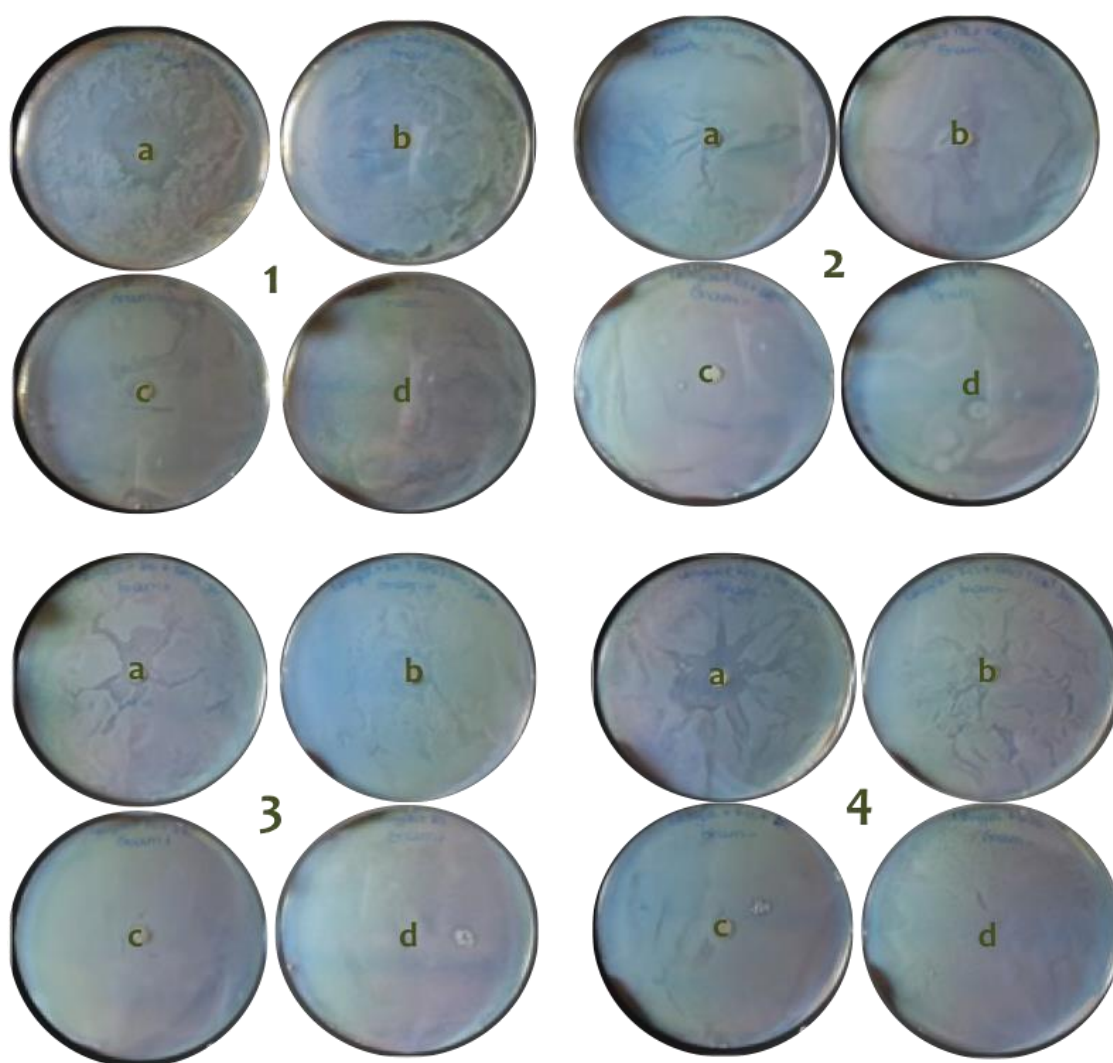


Figura III.22 – Placas contendo LB agar, inoculadas com as diferentes espécies bacterianas e na presença de CgCHI3 a 37 °C. 1 - *E. coli* BL21 (DE3), 2 - *Paracoccus denitrificans*, 3 - *Bacillus subtilis* e 4 - *E. coli* K12. a - Enzima pura, b - Enzima diluída 1:4, c - Controlo com tampão de solubilização da enzima e d - controlo de crescimento das bactérias.

III.6.4.5 – Interação da CgCHI₃ com bactérias simbióticas

A adição de CgCHI₃ aos meios de cultura de *Frankia* e rizóbio, não produziu nenhum efeito aparente no crescimento das culturas (resultados não apresentados). Da mesma forma, o tratamento prévio dos fatores de nodulação de *Frankia* com CgCHI₃ não parece ter efeitos nos estágios iniciais de infecção, a avaliar pela semelhança entre os pelos radiculares encaracolados devido à presença da bactéria, dos fatores de nodulação e dos fatores de nodulação tratados com CgCHI₃ (dados não apresentados).

III.6.4.8 – Estudo cinético da GST

A reação enzimática foi medida pela conjugação de 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com glutatona reduzida (GSH). Do gráfico da Figura III.23 podemos inferir que a CgGST exibe atividade para o substrato em estudo. Quando se usou 0,1 mM de substrato obteve uma velocidade igual a $29,6 \pm 5,3$ U.Abs_{340 nm}/min. A velocidade aumentou para $67,2 \pm 5,3$ U.Abs_{340 nm}/min quando se duplicou a concentração de substrato, diminuindo, no entanto, para $47,7 \pm 5,3$ U.Abs_{340 nm}/min quando se usou 0,4 mM de substrato.

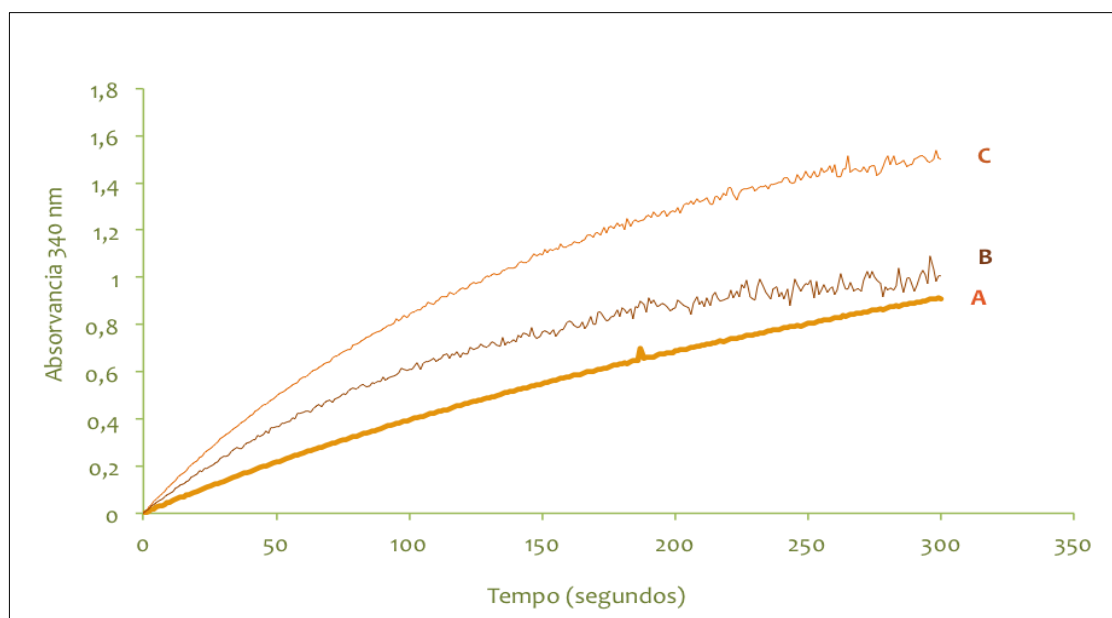


Figura III.23 - Atividade de glutatona-S-transferase da CgGST em 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 6,5, a 25 °C. Em cada ensaio variou-se a concentração de substrato usada: 0,1 mM (curva A), 0,4 mM (curva B) e 0,2 mM (curva C).

Capítulo IV - Discussão

Ao longo do processo evolutivo as plantas desenvolveram várias capacidades sensoriais que lhes permitem captar, interpretar e adaptar aos diversos estímulos ambientais. As plantas actinorrízicas apresentam uma resiliência extraordinária a condições ambientais extremas, assumindo por isso grande relevância no contexto das alterações climáticas. Adicionalmente, este grupo de plantas possui a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de azoto do género *Frankia*. Embora não se conheça qual a relação entre a simbiose e a tolerância aos diversos stresses ambientais, os dois processos requerem uma sequência altamente coordenada de eventos, entre eles a indução de mecanismos relacionados com stress, cujo papel específico durante a interação simbiótica está pouco estudado.

O principal objetivo desta tese foi a clonagem e produção das proteínas recombinantes codificadas por dois genes de defesa envolvidos na simbiose actinorrízica entre *Casuarina glauca* e *Frankia*: uma quitinase da classe III (CgCHI3) e uma glutathione S-transferase (CgGST), para posterior análise funcional.

Apesar das dificuldades encontradas ao longo do processo de sobre-expressão de uma das proteínas, a CgCHI3, a purificação das proteínas recombinantes em estudo foi conseguida com sucesso. Com o objetivo de obter as proteínas em quantidade suficiente, no mais curto espaço de tempo possível, foi utilizado um sistema de expressão heteróloga em bactérias, nomeadamente em células de *E. coli* BL21 (DE3).

IV.1 – CgCHI3

IV.1.1 – Análise bioinformática

A partir de nódulos de *C. glauca*, foi isolado o gene *CgChi3* constituído por 897 pares de bases (Fortunato et al., 2007), que codifica uma endoquitinase ácida da classe III com 298 aminoácidos, 31,9 kDa e um ponto isoelétrico de 6,8 (parâmetros teóricos estimados para a proteína sem caudas de afinidade pela ferramenta *ExPASyParamTool*). A proteína CgCHI3 expressa um péptido sinal que a localiza no apoplasto (informação obtida pela aplicação da

ferramenta WoLF PSORT). O valor do pI, embora um pouco elevado para uma proteína acídica, é semelhante ao determinado para as quitinases dos cornizos, *Cornus florida* ou *C. mas* (Cardwell & McDaniel, 1998) e do feijão-verde (Ye & Ng, 2005). Por outro lado, as proteínas isoladas de plantas superiores e algas exibem normalmente valores de pI compreendidos entre 3,0 e 10, as quitinases de insetos, crustáceos, moluscos e peixes entre 4,7 e 9,3, ao passo que as bacterianas têm pIs na gama 3,5 a 8,8 (Jollès & Muzzarelli, 1999). A massa molecular estimada (31,9 kDa) encontra-se igualmente dentro dos padrões normais para esta classe de enzimas, que no caso das plantas superiores e das algas é aproximadamente igual a 30 kDa. No caso dos moluscos, de alguns vertebrados e de fungos e bactérias a massa molecular pode variar entre 40 e 120 kDa (Jollès & Muzzarelli, 1999). A proteína recombinante híbrida, contendo duas caudas de histidina (N- e C-terminal) e obtida por solubilização dos corpos de inclusão, apresenta uma massa molecular aparente de aproximadamente 35,5 kDa e um pI igual a 7,7 (parâmetros teóricos determinados pela ferramenta ExPASy ProtParam Tool), valores estes normais para quitinases. A quitinase híbrida de *C. glauca* apresenta uma massa molecular aparente nos géis de eletroforese em condições desnaturantes de $32,5 \pm 2,2$ kDa, um pouco abaixo da massa molecular teórica (35,5 kDa).

Por comparação da sequência de aminoácidos da proteína concluiu-se ainda pertencer à família 18 (Figura IV.1) apresentando 65-83% de homologia com as proteínas de outras espécies vegetais (determinados pela ferramenta Basic Local Alignment Search Tool). A análise deste alinhamento mostra que a quitinase de *C. glauca* apresenta os motivos conservados característicos desta família, nomeadamente o motivo catalítico D-X-X-D-X-D-X-E (D145-X2-D148-X-D150-X-E152 na numeração da CgCHI3), em que D representa o resíduo de ácido aspártico, E o de ácido glutâmico e X qualquer aminoácido.

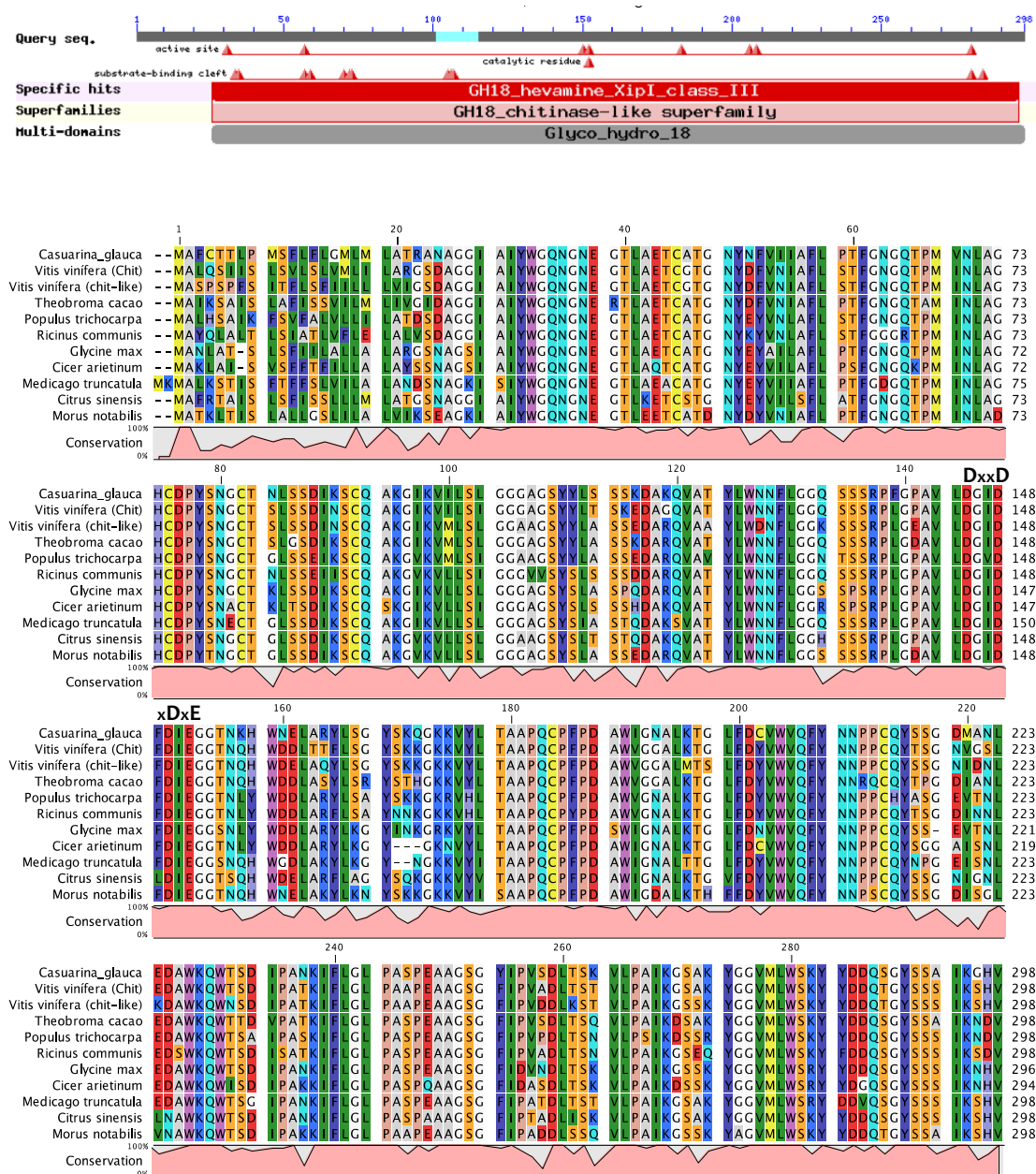


Figura IV.1 – Análise comparativa da estrutura primária da CgCHI3 com outras espécies de plantas reportadas como pertencentes à classe III das quitinasas, família 18 das hidrolases de glicosilo, realizado com o software CLC Sequence Viewer version 7.0.2 (www.clcbio.com). Os números de acesso das proteínas disponíveis no banco de dados do NCBI: endoquitinase ácida de *Vitis vinifera* (XP_002279147.1), endochitinase-like ácida de *Vitis vinifera* (XP_002279205.1), precursor da hevamina-A de *Theobroma cacao* (XP_007021467.1), quitinase de *Populus trichocarpa* (XP_002301383.1), precursor putativo da hevamina-A de *Ricinus communis* (XP_002511934.1), hevamina-A de *Glycine max* (XP_003516317.1), endochitinase-like ácida de *Cicer arietinum* (XP_004490140.1), quitinase classe III de *Medicago truncatula* (AAQ21404.1), hevamina-A hipotética de *Citrus sinensis* (XP_006444927.1) e endoquitinase ácida de *Morus notabilis* (EXB52705.1). Destaca-se o motivo catalítico D145-X-X-D148-X-D150-X-E152.

Por comparação com as estruturas 3D reportadas na literatura, pode-se inferir que o ácido glutâmico 152 deste motivo é o resíduo doador do próton requerido para a hidrólise da ligação glicosídica $\beta(1-4)$ da quitina, facilitando assim o abandono do grupo de saída (Hamid *et al.*, 2013). O resíduo D150 também está envolvido na ligação ao substrato, fixando-o numa conformação distorcida, o que promove o ataque nucleofílico ao carbono anomérico; estabiliza ainda o intermediário enzima-substrato. O resíduo D148 é um aminoácido altamente conservado nas quitinases ácidas da família 18 e tem o papel de manter o resíduo D150 na forma protonada (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

Ainda no que diz respeito às estruturas 3D da família 18 das hidrolases do glicosilo, a maioria tem uma estrutura modular, que para além do domínio catalítico $(\beta/\alpha)_8$, em que 8 folhas β paralelas organizadas em baril estão envoltas por 8 hélices α , contém domínios auxiliares, tais como módulos de ligação a hidratos de carbono, que estabilizam o complexo enzima-substrato, aumentando a atividade catalítica para substratos, ou ainda um domínio rico em serinas e treoninas. De referir que tal como a maioria das quitinases de plantas, aCgCHI3 contém 8 resíduos de cisteína conservados (Figura IV.1) que, de acordo com as estruturas 3D disponíveis, estão em parte (6 Cis) envolvidas na formação de pontes dissulfureto.

A quitinase em estudo pertence igualmente ao grupo das proteínas relacionadas com a patogénese (*PR-proteins*, *Pathogenesis Related-Proteins*), família PR-8, que inclui ainda as enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39), que atuam em resposta a invasões das plantas por agentes patogénicos, tais como fungos e bactérias. Mauch & Staehelin (1989) propuseram um modelo para o mecanismo de defesa das plantas envolvendo a ação sinérgica das β -1,3-glucanases e das quitinases, em que as primeiras atuariam numa fase inicial da infeção, libertando β -1,3-glucanos das hifas fúngicas que depois atuariam como ativadores da expressão de genes de defesa, nomeadamente os que codificam quitinases que, por sua vez, iriam degradar totalmente as paredes celulares dos agentes patogénicos conduzindo à sua lise (Mauch & Staehelin, 1989; Ebrahim *et al.*, 2011). O papel da CgCHI3 em nódulos de *C. glauca* é discutido abaixo, com base nos ensaios cinéticos e biológicos e nos estudos que antecederam este trabalho (Fortunato *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

IV.1.2 – Caracterização bioquímica e da atividade biológica

Relativamente à caracterização cinética da CgCHI₃, vários foram os substratos testados com vista à determinação da sua função e à avaliação do seu papel no processo simbiótico entre *C. glauca* e *Frankia*.

IV.1.2.1 – Atividade de quitinase

Nas condições testadas e usando CM-Chitin-RBV (quitina solúvel ligada a um cromóforo) como substrato, a pH 5,4 e 37 °C, o valor da atividade específica foi de $23,5 \pm 4,2$ U.Abs_{550 nm}/min/mg. O valor obtido é da mesma ordem de grandeza dos reportados para as quitinases de sementes de cevada, nativa e recombinante, que apresentam uma atividade específica de $12 \pm 0,7$ U.Abs_{550 nm}/min/mg para o mesmo substrato (Andersen *et al.*, 1997). A cinética observada para a quitinase recombinante de *C. glauca* (Figura III.17) tem um comportamento idêntico ao detetado aquando da otimização do ensaio de atividade por Saborowski *et al.* (1993). De fato, a variação da absorvância a 550 nm em função do tempo de reação é linear até 0,5 unidades de absorvância, com uma velocidade igual a $7,3 \times 10^{-3}$ U.Abs_{550 nm}/min por comparação com $4,8 \times 10^{-3}$ U.Abs_{550 nm}/min para a CgCHI₃.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos de exoquitinase permitiram confirmar que a CgCHI₃ é uma endoquitinase, na medida em que os valores de atividades específicas determinados foram sempre inferiores a 1% do valor obtido com o controlo positivo do kit da Sigma (Tronsmo & Harman, 1993; Duo-Chuan *et al.*, 2005).

IV.1.2.2 – Atividade lisozimática

A Figura III.18 mostra a dependência da velocidade de lise de células de *Micrococcus lysodeikticus* com a concentração de enzima, observando-se um comportamento linear nas condições testadas. Foi possível determinar uma atividade específica igual a 115 ± 30 U/mg, que é um valor semelhante ao descrito na literatura para enzimas homólogas, nomeadamente para a quitinase do látex do algodão-bravo (*Ipomoea carnea*) que apresenta uma atividade de lisozima entre 69 e 80 U/mg (Patel *et al.*, 2009; 2010). Muitas das endoquitinases da família 18 são descritas como enzimas bifuncionais, exibindo atividades quitinolítica e lisozimática, nomeadamente a hevamina de plantas (Jekbel *et al.*, 1991;

Bokma *et al.*, 2002). Foram ainda descritas quitinases com atividade lisozimática isoladas de plantas e de microrganismos, tais como de *Pseudomonas aeruginosa*, *Choanephora cucurbinatum* e *Phascolomyces articulatus* (Jollès & Muzzarelli, 1999). A lisozima e a quitinase representam um grupo importante de enzimas que hidrolisam polissacáridos. Enquanto que a quitinase atua na quitina, um polímero linear de N-acetilglucosaminas ligadas por ligações β -1,4, presente nas paredes celulares de insetos, crustáceos e fungos, a lisozima (EC 3.2.1.17) hidrolisa o peptidoglicano das paredes das células bacterianas, constituído por resíduos alternados de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico ligados por ligações β -1,4. A semelhança química entre os dois substratos leva a que algumas lisozimas possam usar quitina como substrato, mas com uma eficiência menor do que com o substrato natural e vice-versa. Apesar desta bifuncionalidade, as duas proteínas possuem sequências de aminoácidos com baixa homologia entre si (Wohlkönig *et al.*, 2010).

IV.1.2.3 – Atividade de β -1,3-glucanase

A partir da Figura III.19 determinou-se a atividade específica de β -1,3-endoglucanase da CgCHI3 para o substrato CM-Curdlan-RBB, obtendo-se um valor igual a $0,7 \pm 0,1$ U.Abs_{600 nm}/min/mg. Até à data não foi descrita qualquer quitinase com atividade de β -1,3-glucanase, pelo que este poderá ser o primeiro caso de uma enzima bifuncional quitinase/glucanase. As β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) são proteínas de defesa da família PR-2, constituindo as glucanases mais abundantes. Hidrolisam a ligação glicosídica β -1,3 de glucanos, presentes na parede celular da maioria dos fungos, e dividem-se em 3 classes (I a III). As glucanases da classe I são proteínas básicas com cerca de 33 kDa e localizam-se nos vacúolos; as classes II e III incluem as proteínas ácidas, extracelulares, com massa molecular aproximadamente igual a 36 kDa, tal como a CgCHI3. As β -1,3-glucanases de plantas estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos, tais como esporogénese, fertilização, germinação ou amadurecimento. Para além destas funções, vários estudos *invitro* demonstraram a capacidade antifúngica das enzimas das classes I e II (Stahl, 2004).

IV.1.2.4 – Atividade de β -1,4-glucanase (celulase) da CgCHI3

A atividade específica para o substrato carboximetil celulose da CgCHI3 é de 194 ± 30 U.Abs_{570 nm}/min/mg. A celulose é o componente principal da parede celular das plantas,

constituindo o polissacárido mais abundante na Terra e uma importante fonte de carbono na biosfera. É um polímero linear de resíduos de *D*-glucose ligados por ligações β -1,4. Este polissacárido pode ser degradado pela ação sinérgica de três classes de celulasas, incluindo as β -1,4-endoglucanases (EC 3.2.1.4), as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as β -glucosidases (EC.3.2.1.21). Tal como para a atividade de β -1,3-glucanase, não foi descrita qualquer quitinase com atividade de β -1,4-glucanase. O facto de uma única enzima, caso da CgCHI3, apresentar atividade de quitinase/glucanase/celulase é único e poderá corresponder a uma forma mais eficaz de defesa contra agentes patogénicos ou a um sistema otimizado envolvido no estabelecimento de simbioses. A plasticidade enzimática é muitas vezes associada à promiscuidade das enzimas de, apesar da sua especificidade, terem a capacidade de reconhecer e metabolizar diferentes substratos, evoluindo no sentido de uma melhor eficiência catalítica.

IV.1.2.5 – Atividade antifúngica

A importância das quitinases como componentes de um mecanismo de defesa da planta tem sido alvo de vários estudos (Graham & Sticklen, 1994; Carstens *et al.*, 2003). A quitina, o substrato das quitinases, não foi encontrada em plantas, mas é sintetizada por organismos associados a plantas, em particular como componente da parede celular de fungos verdadeiros. Como mencionado anteriormente, a análise da sequência de aminoácidos, indicou que a CgCHI3 pertence à família das GH18, classe III das endoquitinases ácidas e a proteína recombinante demonstrou ter atividade quitinolítica. Deste modo, o potencial antifúngico da CgCHI3 foi avaliado, não tendo sido observada inibição do crescimento das hifas dos fungos fitopatogénicos testados. Esta ausência de atividade antifúngica foi observada também na quitinase ácida da classe III de sementes de tamarindo (Rao & Gowda, 2008), na quitinase ácida de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) (Vogelsang & Barz, 1993), ou ainda nas 4 enzimas da família GH18 isoladas da bactéria *Streptomyces coelicolor* (Kawase *et al.*, 2006). Apesar de parecer óbvio associar a atividade antifúngica das quitinases à hidrólise da quitina, o que levaria ao enfraquecimento das paredes celulares e subsequente lise das células do agente patogénico, o mecanismo de inibição do crescimento fúngico não poderá explicar-se exclusivamente pela atividade quitinolítica, na medida em que, tal como acima mencionado, são várias as quitinases que hidrolisam quitina mas que não apresentam atividade contra fungos. Por outro lado, há que considerar que a

CgCHI3 é uma enzima multifuncional, cuja expressão está estritamente associada a processos simbióticos (Fortunato *et al.*, 2007; Tromas *et al.*, 2012). Os resultados obtidos parecem confirmar estas observações.

IV.1.2.6 – Atividade antibacteriana

Algumas quitinases apresentam maior atividade em peptidoglicanos bacterianos do que na quitina, sendo por este motivo classificadas como lisozimas (Brunner *et al.*, 1998). As lisozimas estão definidas como enzimas com atividade hidrolítica específica direcionada contra os peptidoglicanos, componentes da parede celular bacteriana (mureína) tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. A atividade bacteriolítica, *invitro*, de diferentes lisozimas em variados organismos, é bem conhecida (During, 1993). Além disso, em várias espécies de plantas tem sido detetada a presença de lisozimas (Howard *et al.*, 1967; Glazer *et al.*, 1969; Bernasconi *et al.*, 1987; Audy *et al.*, 1988; Kombrink *et al.*, 1988; Trudel *et al.*, 1989; Stintzi *et al.*, 1993). Deste modo, o potencial antibacteriano da CgCHI3 foi avaliado, tendo sido observada inibição do crescimento, demonstrando que as espécies bacterianas estudadas apresentam sensibilidade a esta enzima. Estes resultados estão em linha com a atividade lisozimática da CgCHI3, acima referida.

IV.1.2.6 – Interação com bactérias simbióticas

Algumas quitinases, como parece ser o caso da CgCHI3, não são induzidas por agentes patogénicos, mas sim em resposta a interações simbióticas (Fortunato *et al.*, 2007). Em algumas interações, foram estudados os requisitos estruturais para as respostas desencadeadas pelos fatores de nodulação (Nod). Sabe-se que as quitinases de leguminosas produzidas durante o desenvolvimento do nódulo podem degradar fatores Nod (Goormachtig *et al.*, 1998). Sendo a CgCHI3 uma nodulina precoce, específica de nódulos (Fortunato *et al.*, 2007), foi testado o seu possível envolvimento na interação com as bactérias simbióticas, *Frankia* e rizóbio. Em ambos os casos, a presença de CgCHI3 no meio de cultura não afetou o crescimento bacteriano. Da mesma forma, o tratamento dos fatores de nodulação da bactéria *Frankia* com CgCHI3 não produziu alterações de registo nos estágios precoces da infeção, isto é, adesão e encaracolamento dos pelos radiculares em *Alnus glutinosa*. Esta observação, sugere que a CgCHI3 não interage diretamente com os

fatores de nodulação da bactéria. De facto, ao contrário do que acontece com os fatores Nod de rizóbio, compostos por lipo-quito-oligossacáridos, até à data não foi reportada a presença de quitina nos fatores de *Frankia*.

IV.1.3 – Função no processo simbiótico

Segundo Fortunato *et al.* (2007), o gene *CgChi3* apresenta atividade transcricional específica em nódulos e preferencial na zona de infeção por bactérias do género *Frankia*. Com base nestas observações, os autores apontaram três possíveis funções para este gene durante o processo simbiótico: i) reconhecimento da bactéria; ii) processo de infeção; e/ou iii) formação do nódulo. Pelas razões acima expostas, o envolvimento da *CgCHI3* no processo do reconhecimento da bactéria parece ser pouco provável. Por seu turno, a localização no apoplasto em conjunto com as funções de celulase e glucanase, sugerem que esta enzima poderá estar envolvida no processo de penetração intracelular da bactéria, participando nas modificações estruturais subjacentes, como por exemplo, na digestão da parede celular (celulase) e/ou formação do canal de infeção que envolve o microsimbionte (glucanase). De facto, vários autores apontam o envolvimento de β -1,4 glucanases (celulases) no metabolismo da parede celular de plantas superiores, incluindo a biossíntese e degradação de celulose e a modificação de outros polissacáridos da parede que contêm resíduos de (1,4) β -glicosilos (Buchanan *et al.*, 2012). No caso da atividade β -1,3 glucanase, poder-se-á inferir que a *CgCHI3* atua quebrando as ligações β -1,3 dos glucanos da calose que é depositada em resposta à infeção (Nowicki *et al.*, 2013). Embora os resultados obtidos não permitam especular sobre o envolvimento da *CgCHI3* no processo de formação do nódulo, esta hipótese não poderá ser excluída.

IV.2 – CgGST

IV.2.1 – Análise bioinformática

A partir de nódulos de *C. glauca*, foi isolado o gene *CgGst*, constituído por 660 pares de bases (Santos *et al.*, 2010), que codifica uma glutathione S-transferase com 219 aminoácidos, 25,6 kDa e um ponto isoelétrico de 5,3 (parâmetros teóricos determinados pela ferramenta *ExPASyParamTool*). A massa molecular e o valor de pI estimados da proteína recombinante

proteínas citosólicas, realizado com o software CLC Sequence Viewer version 7.0.2 (www.clcbio.com). Os números de acesso das proteínas disponíveis no banco de dados do NCBI, são: GST tau 1 *Hevea brasiliensis* (XP_004294220.1), GST de *Ricinus communis* (XP_006442220.1), GST de *Vitis vinifera* (XP_006478015.1), GST homóloga de *Fragaria vesca subsp. vesca* (XP_002264437.1), GST de *Morus notabilis* (CAA04391.1), glutathione transferase de *Carica papaya* (ACI42271.1) proteína hipotética de *Citrus clementina* (AEF79856.1), proteína homóloga à GST de *Citrus sinensis* (XP_002532823.1), GST tau2 de *Citrus sinensis* (EXB96020.1).

A proteína recombinante purificada de *C. glauca* apresentou uma massa molecular aparente nos géis de eletroforese em condições desnaturantes de $26,6 \pm 0,9$ kDa, semelhante à massa molecular deduzida da sequência de nucleótidos do gene (27,4 kDa). Esta possui os resíduos Ser13, Lis40, Ile54, Glu66 e Ser67, identificados como sítios ativos de ligação à GSH em proteínas de pinheiro (tau PtGSTU1), trigo (tau GST TaGSTU4) e arroz (tau GST OsGSTU1) (Zeng et al., 2005; Zeng & Wang, 2005). Segundo Zeng & Wang (2005), mutações nestes locais induzem alterações significativas na atividade enzimática, especificidade para o substrato e estabilidade térmica. Para além disso, Ile54 está envolvida no processo de *folding* das proteínas.

IV.2.2 – Caracterização bioquímica

As glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) constituem uma superfamília de enzimas multifuncionais codificadas por uma vasta família de genes presentes nas plantas. Estas enzimas catalisam a conjugação nucleofílica do tripéptido glutathione reduzido (GSH; γ -Glu-Cis-Gli) numa variedade de compostos hidrofóbicos e eletrofílicos, para os direcionar para locais específicos intra e extracelularmente. Relativamente ao que tem sido reportado em outras plantas, a proteína CgGST mostrou elevada atividade para o substrato CDNB (substrato clássico em estudos cinéticos de GSTs). A Figura III.24 mostra os traços cinéticos obtidos para três concentrações diferentes de substrato. Para concentrações mais elevadas determinou-se uma menor velocidade, o que poderá indicar inibição pelo substrato ou pelo produto.

As GSTs estão descritas como envolvidas na proteção dos tecidos contra o stresse oxidativo ou produtos tóxicos produzidos durante o metabolismo de xenobióticos (Frova, 2003; 2006). Além disso, as GSTs de plantas desempenham também funções menos estudadas no metabolismo endógeno incluindo a sua função como peroxidases de glutathione no stresse oxidativo (Cummins et al., 1999), proteínas de ligação a flavonoides

(Mueller *et al.*, 2000), proteínas sinalizadoras de stresse (Loyall *et al.*, 2000) e reguladoras da apoptose (Kampranis *et al.*, 2000). As GSTs de plantas podem ainda ser induzidas por uma grande variedade de fito-hormonas, incluindo o ácido salicílico, auxinas, etileno, jasmonato de metilo e ácido abscísico (Wagner *et al.*, 2002; Moons, 2003; Smith *et al.*, 2003; Sappl *et al.*, 2004). Uma vez que todas estas hormonas regulam muitos aspetos do desenvolvimento da planta, as GSTs podem também desempenhar um papel crucial no desenvolvimento vegetal.

IV.2.3 – Função no processo simbiótico

Em trabalhos anteriores, verificou-se que a actividade transcricional do gene *CgGst* é regulada positivamente pelo ácido abscísico e por fermento, o que sugere uma função específica deste gene na proteção do nódulo (Santos *et al.*, 2010). Estes resultados, aliados ao perfil de atividade da CgGST, reforçam a ideia desta ser uma importante proteína antioxidante. A presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de antioxidantes em nódulos tem sido descrita por vários autores (Matamoros *et al.*, 2003; Balestrasse *et al.*, 2005; Naya *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2007; Minchin *et al.*, 2008; Dalton *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). No caso das leguminosas, acredita-se que as leghemoglobinas (envolvidas na proteção da nitrogenase contra a ação do oxigénio), em conjunto com as elevadas taxas de respiração, sejam a principal fonte de ROS (Günther *et al.*, 2007). Por outro lado, segundo Matamoros *et al.* (2003), o mecanismo mais comum de remoção de ROS em plantas ocorre pela via do ascorbato-glutationa, na qual a GST desempenha um papel chave. O facto de que, à semelhança do que acontece em leguminosas, os nódulos de *C. glauca* contêm elevados níveis de hemoglobina (Jacobsen-Lyon *et al.*, 1995), sugere a existência de um mecanismo semelhante de produção e remoção de ROS e que a CgGST poderá estar envolvida no processo. Em todo o caso, os resultados não excluem a hipótese desta proteína ter funções específicas nas vias de sinalização, na regulação da apoptose ou no desenvolvimento do nódulo.

Capítulo V - Considerações finais

O estudo de eventos relacionados com a defesa em simbioses tem aumentado notavelmente nos últimos anos. Embora hajam avanços consideráveis em leguminosas, nas simbioses actinorrízicas este tipo de estudos está ainda numa fase embrionária.

Estudos anteriores permitiram concluir que os genes *CgChi3* e *CgGST*, que codificam proteínas clássicas de situações de stresse, participam no processo simbiótico estabelecido entre *C. glauca* e *Frankia* (Fortunato *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010). Neste contexto, foi efetuada a produção, purificação e análise funcional das proteínas *CgCHI3* e *CgGST*.

Com base nos resultados obtidos, a *CgCHI3* mostrou ser uma enzima multifuncional, apresentando atividades quitinolítica, lisozimática, de glucanase e de celulase. Até à data não foi descrita qualquer quitinase com atividades de β -1,3- e β -1,4-glucanase, pelo que este poderá ser o primeiro caso. Para além da sua importância no processo simbiótico, esta proteína poderá também ser valorizada, tendo em conta as potenciais aplicações biotecnológicas, como por exemplo na indústria de papel, têxtil, de bebidas, nutrição animal ou produção de detergentes. O interesse por estas enzimas tem aumentado muito devido à sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais. No seguimento deste trabalho poder-se-á explorar os sítios ativos de quitinases e as novas funções associadas, visando a produção de quitinases com funções exclusivas.

Em relação à GST, com menos valor comercial, mas não menos importante do ponto de vista fundamental, será interessante aprofundar os estudos de análise funcional no sentido de perceber melhor o seu papel na simbiose, avaliando se a sua função se resume à remoção de ROS ou se estende a processos de sinalização, como por exemplo a troca de sinais entre a planta e a bactéria ou indução de sistema de defesa sistémico, e/ou de desenvolvimento da estrutura do nódulo.

As ferramentas moleculares atualmente disponíveis em *C. glauca*, nomeadamente o sistema de transformação por RNAi poderão ser explorados no sentido de esclarecer a função dos genes *CgChi3* e *CgGst* durante o processo simbiótico; da mesma forma, a análise integrada do transcrito (Tomas *et al.*, 2012), proteoma e metaboloma (em curso no

nosso laboratório), serão certamente de grande utilidade para uma visão holística do funcionamento destes genes em particular e da simbiose em geral.

Bibliografia

Abram, A. P., Higuera, I. (2004) *Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones*; Abram, A. P., ed.; Programa Cyted - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, 2004, cap 1.

Ana Sofia Fortunato (2006) Involvement of defense-related genes during *Casuarina glauca* nodulation. (ITQB/UNL).

Andersen, M.D., Jensen, A., Robertus, J.D., Leahy, R., Skriver K. (1997) Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochemistry Journal* 322, 815±822.

Armstrong, R. (1998) Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 618-623.

Audy, P., Benhamou, N., Trudel, J., Asselin, A. (1988) Immunocytochemical localization of a wheat germ lysozyme in wheat embryo and coleoptile cells and cytochemical study of its interaction with the cell wall. *Plant Physiology* 88, 1317–1322.

Becana, M., Matamoros, M.A., Udvardi, M., Dalton, D.A. (2010) Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist* 188, 960–976.

Benson, D.R., Brooks, J.M., Huang, Y., Bickhart, D.M., Mastronunzio, J.E. (2011) The biology of *Frankia* sp. strains in the post-genome era. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 24, 1310–1316.

Benson, D.R., Clawson, M.L. (2000) Evolution of the actinorhizal plant symbioses; in *Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process* (ed) EW Triplett (Wymondham: Horizon Scientific Press) pp 207–224.

Benson, D.R., Silvester, W.B. (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57, 293–319.

Bent, A.F. (1996) Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *The Plant Cell* 8, 1757-1771.

Bernasconi, P., Locher, R., Pilet, P.E., Jollès, J., Jollès, P. (1987) Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* 915, 254–260.

Berry, A.M., Harriott, O.T., Moreau, R.A., Osman, S.F., Benson, D.R., Jones, A.D. (1993) Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6091–6094.

Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K. (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology* 27, 21–28.

Bittner-Eddy, P.D., Beynon, J.L. (2001) The *Arabidopsis* Downy Mildew Resistance Gene, *RPP13-Nd*, Functions Independently of *NDR1* and *EDS1* and does not Require the Accumulation of Salicylic Acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 416-421.

Blocki, F.A., Schlievert, P.M., Wackett, L.P. (1992) Rat liver protein linking chemical and immunological detoxification systems. *Nature* 360, 269-270.

Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Holth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J. (2000) Identification, characterization and crystal structure of the omega class of glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24798–24806.

Bokma, E., Rozeboom, H.J., Sibbald, M., Dijkstra, B.W., Beintema, J.J. (2002) Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *European Journal of Biochemistry* 269, 893-901.

Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnson, R.D., Kleinig, D.A., McDonald, M.W., Turner, J.D. (2006) *Forest Trees of Australia*. CSIRO Publishing, Collingwood.

Brameld, K.A., Shrader, W.D., Imperiali, B., Goddard, W.A. (1998) Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 280, 913-923.

Broughton, W.J., Dilworth, M.J. (1971) Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochemical Journal* 125, 1075-1080.

Brunner, F., Stintzi, A., Fritting, B., Legrand, M. (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant Journal* 14, 225-234.

Buchanan, M., Burton, R.A., Dhugga, K.S., Rafalski, A.J., Tingey, S.V., Shirley, N.J., Fincher, G.B. (2012) Endo-(1,4)- β -Glucanase gene families in the grasses: temporal and spatial Cotranscription of orthologous genes. *BMC Plant Biology* 12, 235.

Burke (2005) <http://www.burkesbackyard.com.au/factsheets/Trees-and-Palms/Casuarinas/1338>.

Callaham, D., Del Tredici, P., Torrey, J.G. (1978) Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199, 899–902.

Callaham, D., Torrey, J.G. (1977) Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (Myricaceae). *Canadian Journal of Botany* 55, 2306–2318.

Cardwell, N.A., McDaniel, G.L. (1998) Comparison of chitinases from dogwood anthracnose resistant and susceptible *Cornus* species. *Hortscience* 33, 298-301.

Carstens, M., Vivier, M.A., Pretorius, I.S. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Research* 12(4), 497-508.

Catarina Lopes dos Santos (2009) Oxidative Stress Response in Free-Living and Symbiotic Frankiae. Molecular and Phylogenetic Studies. Faculdade de Ciências da universidade do Porto.

Chen, P.J., Wei, T.C., Chang, Y.T., Lin, L.P. (2004) Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45, 111-118.

Chi, Y., Cheng, Y., Vanitha, J., Kumar, N., Ramamoorthy, R., et al. (2011) Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in sorghum and other higher plants. *DNA Research* 18, 1-16.

Cho, H.Y., Kong, K.H. (2007) Study on the biochemical characterization of herbicide detoxification enzyme, glutathione S-transferase. *Biofactors* 30, 281-287.

Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant Journal* 18, 285-292.

Da Silva, J.G., Serra, G.E., Moreira, J.R., Goncalves, J.C., Goldenberg, J. (1978) Energy balance for ethyl alcohol production for crops. *Science* 210, 903-906.

Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 773-782.

Dalton, D.A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H.J., Jelinek, L., Govindarajulu, M., Finger, R.E., Taylor, C.G. (2009) Physiological Roles of Glutathione S-Transferases in Soybean Root Nodules. *Plant Physiology* 150(1), 521-530.

Dawson, J.O. (1990) "Interactions among actinorhizal and associated plant species" in *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants* edited by Schwintzer CR and Tjepkema JD, Eds, Academic Press, New York, 299-316.

Dawson, J.O. (2008) "Ecology of actinorhizal plants" in *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses Nitrogen fixation research: Origins and progress*, Pawlowski K and Newton WE, Eds, Springer, New York, USA, 6, 199-234.

de los Reyes, B.G., Taliaferro, C.M., Anderson, M.P., Melcher, U., McMaugh, S. (2001) Induced expression of the class II chitinase gene during cold acclimation and dehydration of bermudagrass (*Cynodon* sp.). *Theoretical and Applied Genetics* 103, 297-306.

Desbrosses, G.J., Stougaard, J. (2011) Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host and Microbe* 10, 348–358.

Diem, H.G., Dommergues, Y.R. (1990) Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics; in *The biology of Frankia and actinorhizal plants* (eds) CR Schwintzer, JD Tjepkema (New York: Academic Press) pp 317–342.

Diouf, D., Diop, T.A., Ndoye, I. (2003) Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? *African Journal of Biotechnology* 2, 1–7.

Dixon DP, Edwards R (2010) Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book* 8: e0131.

Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002) Plant Glutathione Transferases. *Genome Biology reviews* 3004.1-3004.10.

Dixon, D.P., McEwen, A.G., Laphorn, A.J., Edwards, R. (2003) Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *Journal of Biological Chemistry* 278, 23930-23935.

Dobermann, A. (2007) Nutrient use efficiency-measurement and management in a time of new challenges. In: *Proceedings of the IFA International Workshop on Fertilizer Best Management Practices. Fertilizer Best Management Practices*, 7 – 9, Brussels, Belgium. International Fertilizer Industry Association, 1–28.

Dobritsa, S.V., Potter, D., Gookin, T.E., Berry, A.M. (2001) Hopanoid lipids in *Frankia*: identification of squalene-hopene cyclase gene sequences. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 535–540.

Doran, J.C., Turnbull, J.W. (eds.) (1997) *Australian Trees and Shrubs: species for land rehabilitation and farm planting in the tropics*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra [ACIAR books online: <http://www.aciar.gov.au/publication/MN024>].

Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., Vuillard, L. (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein expression and purification* 37, 203-206.

Duo-Chuan, L.I., et al. (2005) Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159, 223-229.

During, K. (1993) Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? *Plant Molecular Biology* 23, 209-214.

Ebrahim, S., Usha, K., Singh B. (2011) Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (Ed.)“Chitin and chitinases”. Ed by P. Jollès and R.A.A. Muzzarelli, Birkhäuser Verlag, 1999.

Edwards, R., Dixon, D.P. (2005) Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 401, 169-186.

Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000) Plant Glutathione S-Transferases: Enzymes with Multiple Functions in Sickness and in Health. *Trends in Plant Science* 5, 193-198.

Elfers, S. (1988) Element stewardship abstract for *Casuarina equisetifolia*. The Nature Conservancy, Arlington, VA.

Elhamid, A.M.I., Makboul, H.E., Sedik, M.Z., Ismail, Ibrahim, M.A. (2010) Cloning, Expression and Antifungal Activity of an Endochitinase Gene Derived from Barley (*Hordeum Vulgare*). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6, 356-363.

Fortunato, A., Santos, P., Graça, I., Gouveia, M.M., Martins, S.M., Ricardo, C.P.P., Pawlowski, K., Ribeiro, A. (2007) Isolation and characterization of *cgchi3*, a nodule-specific gene from *Casuarina glauca* encoding a class III chitinase. *Physiologia Plantarum* 130, 418-426.

Franché, C., Bogusz, D. (2012) Signaling and communication in the actinorhizal symbiosis; in Signaling and communication in plant symbiosis (eds) S Perotto and F Baluska (Berlin: Springer) pp 73-92.

Franco, A.A., Dobereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phitopatologica* 20, 68-74.

Frova, C. (2003) The Plant Glutathione Transferase Gene Family: Genomic Structure, Functions, Expression and Evolution. *Physiologia Plantarum* 119, 469-479.

Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* 23, 149-169.

Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein and Peptide Science* 1, 105-124.

Gamas, P., de Billy, F., Truchet, G. (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defense proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 393-403.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31, 3784-3788.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*. Humana, New York, pp. 571-607.

Gerhardt, L.B.D., Sachetto-Martins, G., Contarini, M.G., Sandroni, M., Ferreira, R.D., de Lima, M.V., Cordeiro, M.C., de Oliveira, D.E., Margis-Pinheiro, M. (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 419, 69–75.

Ghasemi, S., Ahmadian, G., Sadeghi, M., Zeigler, D.R., Rahimian, H., Ghandili, S., Naghibzadeh, N., Dehestani, A. (2011) First Report of a bifunctional chitinase/Lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 225-231.

Girgis, Z.G.M., Ishac, Z.Y., El-Haddad, M., Saleh, A.E., Diem, H.G., Dommergues, R.Y. (1990) First Report on Isolation and Culture of Effective *Casuarina*-Compatible Strains of *Frankia* from Egypt., p. 156-164. In J. W. T. M.H. El-Lakany, J.L. Brewbaker (ed.), *Advances in Casuarina Research and Utilization*. A.U.C., Cairo.

Glazer, A.N., Barel, A.O., Howard, J.B., Brown, D.M. (1969) Isolation and characterization of fig lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 244, 3583–3589

Gong, H.B., Jiao, Y.X., Hu, W.W., Pua, E.C. (2005) Expression of glutathione S-transferase and its role in plant growth and development *in vivo* and shoot morphogenesis *in vitro*. *Plant Molecular Biology* 57, 53-66.

Goormachtig, S., Lievens, S., van de Velde, W., van Montagu, M., Holsters, M. (1998) *Srchi13*, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *The Plant Cell* 10, 905–915.

Graham, L.S., Sticklen, M.B. (1994) Plant Chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72, 1057-1083.

Gunther, C., Schlereth, A., Udvardi, M., Ott, T. (2007) Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20, 1596–1603.

Hahn, D. (2008) Polyphasic taxonomy of the genus *Frankia*; in *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses. Nitrogen fixation: Origins, applications, and research progress*, vol. 6 (eds) K Pawlowski, WE Newton (Dordrecht: Springer) pp 25–47.

Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., Javed, S. (2013) Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 5, 21-29.

Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C.K., Tronsmo, A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83, 313–318.

Harriott, O.T., Khairallah, L., Benson, D.R. (1991) Isolation and structure of the lipid envelopes from the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* sp. Strain Cpl1. *Journal of Bacteriology* 173, 2061–2067.

Harrison, S.J., Curtis, M.D., McIntyre, C.L., Maclean, D.J., Manners, J.M. (1995) Differential Expression of Peroxidase Isogenes During the Early Stages of Infection of the Tropical Forage Legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8,398-406.

He, X.H., Critchley, C. (2008) *Frankia* nodulation, mycorrhization and interactions between *Frankia* and mycorrhizal fungi in *Casuarina* plants. in *Mycorrhiza* (ed) A Varma (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag) pp 767–781.

Henrissat, B. (1991) Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal* 280, 309-316.

Henrissat, B., Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal* 293, 781-788.

Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Nakai, K. (2006) Presented at the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBCo6, Taipei, Taiwan.

Howard, J.B., Glazer, A.N. (1967) Studies on the physicochemical and enzymatic properties of Papaya lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 242, 5715–5723.

Huss-Danell, K. (1997) Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytologist* 136, 375–405.

Huxley, A. (1992) *New RHS Dictionary of Gardening*. Macmillan Publishers. ISBN 0-333-47494-5.

Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J.M., Henrissat, B. (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters* 382(1-2), 186–188.

Jacobsen-Lyon, K., Jensen, E.O., Jorgensen, J., Marcker, K.A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1995) Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*. *Plant Cell* 7,213–223.

Jain, M., Ghanashyam, C., Bhattacharjee, A. (2010) Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics* 11, 73.

Jekbl, P.A., Hartmann J.B.H., Beintema J.J. (1991) The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex, *European Journal of Biochemistry* 200, 123-130.

Jiang, H.W., Liu, M.J., Chen, I.C., Huang, C.H., Chao, L.Y., Hsieh, H.L. (2010) A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiology* 154, 1646–1658.

Jollès, P., Muzzarelli, R.A.A. (1999) Chitin and Chitinases. Birkhauser Verlag; Basel, Switzerland.

Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., et al. (2000) A novel plant

glutathione S-transferase/oxidoreductase suppresses Bax lethality in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29207–29216.

Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases – regulation and functions. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8, 809–824.

Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T. (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70(4), 988–998.

Kim, H.B., An, C.S. (2002) Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. *Molecular Plant—Microbe Interactions* 15, 209–215.

Kim, Y.J., Kim, H.B., Baek, H.E., Heu, S., An, C.S. (2005) Constitutive expression of two endochitinases from root nodules of *Elaeagnus umbellata* confers resistance on transgenic *Arabidopsis* plants against the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Biology* 48, 39–46.

Kirubakaran, I., Sakthivel, N. (2007) Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. *Protein Expression and Purification* 56, 100–109.

Klemmedson, J.O. (1979) Ecological importance of actinomycete-nodulated plants in the western United States. *Botanical Gazette* 140, 591–596.

Kombrink, E., Schroder, M., Hahlbrock, K. (1988) Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 6750–6754.

Kuranda, M., Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19758–19767.

Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 569–593.

Lan, T., Yang, Z.L., Yang, X., Liu, Y.J., Wang, X.R., et al. (2009) Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell* 21, 3749–3766.

Little, E.L. Jr Skomen, R.G. (1989) Common forest trees of Hawaii (native and introduced). *Agricultural Handbook* 679. Washington, DC: U.S Department of Agriculture, Forest Service. 321, 9433.

Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., Frohnmeyer, H. (2000) Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signalling to chalcone synthase in cell cultures. *The Plant Journal* 25, 237–245.

Mannervik, B., Danielson, U.H. (1988) Glutathione transferases structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry* 23(2), 283–337.

Martin, J.L. (1995) Thioredoxin- a fold for all reasons. *Structure* 3, 245– 250.

Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C., Becana, M. (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* 133, 499–509.

Mauch, F., Staehelin L.A., (1989) Functional Implications of the Subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and [β]-1,3-Glucanase in Bean Leaves. *Plant Cell* 1(4), 447–457.

Meier, B.M., Shaw, N., Slusarenko, A.J. (1993) Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 453–466.

Minchin, F.R., James, E.K., Becana, M. (2008) Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In MJ Dilworth, EK James, JI Sprent, WE Newton, eds, *Nitrogen-Fixing Symbioses*. Springer, New York, pp 321–362.

Moons, A. (2003) *Osgstu3* and *osgstu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 553, 427–432.

Moons, A. (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Plant Hormones* 72, 155–202.

Müller, R., Lind-Iversen, S., Stummann, B.M., Serek, M. (2000) Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 5, 12–18.

NAS, 1983. Firewood crops: shrub and tree species for energy production, Volume 2. National Academy of Science.

National Research Council 1984 Casuarinas: nitrogen-fixing trees for adverse sites (Washington: National Academic Press).

Naya, L., Ladrera, R., Ramos, J., González, E.M., Arrese-Igor, C., Minchin, F.R. BECANA, M. (2007) The Response of Carbon Metabolism and Antioxidant Defenses of Alfalfa Nodules to Drought Stress and to the Subsequent Recovery of Plants. *Plant Physiology*, 144, 1104–1114.

Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., Bieseler, B. (1997) Crystal Structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: Evidence for an induced-fit mechanism. *Journal of Molecular Biology* 274, 446-453.

Neuhaus, J.M., Fritig, B., Linthorst, H.J.M., Meins, F., Mikkelsen, J.D., Ryals, J. (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 14, 102-104.

Normand, P., Lalonde, M. (1982) Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 1133-1142.

Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L.S., Gogarten, J.P., Alloisio, N., Bagnarol, E., Bassi, C.A., Berry, A.M., et al. (2007) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Research* 17, 7-15.

Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., et al. (1996) Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 1-9.

Nowicki, Marcin, et al. (2013) A simple dual stain for detailed investigations of plant-fungal pathogen interactions, Vegetable Crops Research bulleting, In Hort & Versita

Oakley, A.J. (2005). Glutathione transferases: New functions. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 716-723.

Oldroyd, G.E., Downie, J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59, 519-546.

Oztetik E. (2008) A tale of plant glutathione S- transferases: since 1970. *Botanical Review* 74, 419-37.

Passardi, F., Longet, D., Penel, C., Dunand, C. (2004) The Class III Peroxidase Multigenic Family in Rice and its Evolution in Land Plants. *Phytochemistry* 65, 1879-1893.

Patel, A.K., Singh, V.K., Yadav, R.P., Moir, A.J.G., Jagannadham, M.V. (2009) ICChI, a glycosylated chitinase from the latex of *Ipomoea carnea*. *Phytochemistry* 70, 1210-1216

Patel, A.K., Singh, V.K., Yadav, R.P., Moir, A.J.G., Jagannadham, M.V. (2010) Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process Biochemistry* 45, 675-681.

Patil, R.S., Ghomade, V., Deshpande, M.V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbial Technology* 26, 473-483.

Pawlowski, K. (2009) Induction of actinorhizal nodules by *Frankia*. In: Pawlowski K. ed. Prokaryotic symbionts in plants. Berlin: Springer, 127-154.

Pawlowski, K., Demchenko, K.N. (2012) The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*

249, 967-979.

Pemble, S.E., Taylor, J.B. (1992) An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochemical Journal* 287, 957-963.

Péret, B., Swarup, R., Jansen, L., et al. (2007) Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiology* 144, 1852–1862.

Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E. (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180.

Peumans, W.J., Proost, P., Swennen, R.L., van Damme, E.J. (2002) The Abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology* 130, 1063–1072.

Pless, D.D., Lennarz, W.J. (1977) Enzymatic Conversion of Proteins to Glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 134-138.

Provost & Wallert research mn state university moorhead est. 1998 (<http://web.mnstate.edu/provost/Enzyme%20Assay%20for%20Glutathione%20STransferase%20Protocol%202012.pdf>).

Rao, D.H., Gowda, L.R. (2008) Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (*Tamarindus indica*) seed serves as the major storage protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6), 2175-82.

Regalado, A.P., Ricardo, C.P.P. (1996) Study of the intercellular fluid of healthy *Lupinus albus* organs: presence of chitinase and a thaumatin-like protein. *Plant Physiology* 110, 227-232.

Regalado, A.P., Pinheiro, C., Vidal, S., Chaves, I., Ricardo, C.P.P., Pousada C.R. (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta* 210, 543-550.

Ribeiro, A., Akkermans, A.D.L., van Kammen, A., Bisseling, T., Pawlowski, K. (1995) A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *The Plant Cell* 7, 785–794.

Ribeiro, A., Graça, I., Pawlowski, K., Santos, P. (2011) Actinorhizal plant defence-related genes in response to symbiotic *Frankia*. *Functional Plant Biology* 38, 639-644.

Roberts, G.A. (1992). Structure of chitin and chitosan. *Chitin chemistry* 1-100.

Rosjohn, J., Board, P.G., Parker, M.W., Wilce, M.C.J. (1996) A structurally derived consensus pattern for Theta class glutathione transferases. *Protein Engineering* 9, 327-332.

Rudall, K.M. (1963) The chitin/protein complexes of insect cuticles. *Advances in Insect Physiology* 1,257-313.

Rudall, K.M. (1967) Conformation of Biopolymers. In: Ramachandran, G. N., editor). New York: Academic Press.

Saborowski, R., Buchholz, F., Vetter, R.A.H., Wirth, S.J., Wolf, G.A. (1993) A soluble, dye-labelled chitin derivative adapted for the assay of krill chitinase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105B , 673-678,

Sahai, A.S., Manocha, M.S. (1993) Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 11, 317–38.

Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli, R., Aeschbacher, R.A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R., Boller, T. (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 763- 777.

Samac, D.A., Graham, M.A. (2007) Recent advances in legume–microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. *Plant Physiology* 144, 582–587.

Samac, D.A., Shah, D.M. (1991) Developmental and pathogen-induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. *Plant Cell* 3, 1063–1072.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, C.L., Tavares, F. (2011) A step further on *Frankia* biology. *Archives of Microbiology* 194(1), 1-2

Santos, P., Fortunato, A., Graca, I., Martins, S., Gouveia, M., Auguy, F., Bogusz, D., Ricardo, C.P.P., Pawlowski, K., Ribeiro, A. (2010) Characterization of four defense-related genes up-regulated in root nodules of *Casuarina glauca*. *Symbiosis* 50, 27–35.

Santos, P., Fortunato, A., Ribeiro, A., Pawlowski, K. (2008) Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnology* 25, 299–307.

Sappl, P.G., Onate-Sanchez, L., Singh, K.B., Millar, A.H. (2004) Proteomic analysis of glutathione S -transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid- induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Molecular Biology* 54,205–219.

Sasaki, C., Itoh, Y., Takehara, H., Kuhara, S., Fukamizo, T. (2003) Family, 19 chitinase from rice (*Oryza sativa* L.): substrate-binding subsites demonstrated by kinetic and molecular modeling studies. *Plant Molecular Biology* 52, 43-52.

Schultze, M., Kondorosi, A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics* 32, 33–57.

Schwencke, J. (1991) Rapid, Exponential Growth and Increased Biomass Yield of Some *Frankia* Strains in Buffered and Stirred Mineral Medium (BAP) with Phosphatidyl Choline. *Plant Soil* 137, 37–41.

Shahidi, F., Abozaytoun, R. (2005) Chitin, chitosan and coproducts: Chemistry, production, applications and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research* 49, 93–135.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360, 1–16.

Shugar, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultraviolet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 8, 302–309.

Silvester, W.B., Harris, S.L., Tjepkema, J.D. (1990) Oxygen regulation and hemoglobin. In: Schwintzer RC, Tjepkema JD. eds. *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. San Diego, CA: Academic Press, 157–176.

Singla, B., Tyagi, A.K., Khurana, J.P. Khurana, P. (2007) Analysis of expression profile of selected genes expressed during auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base system of wheat (*Triticum aestivum*) and their possible interactions. *Plant Molecular Biology* 65, 677–692.

Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B. (2003) *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant Journal* 36, 433–442.

Soto, M.J., Dominguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., Olivares, J. (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant– bacteria interactions. *Cellular Microbiology* 11, 381–388.

Sprent, J.I., Parsons, R. (2000) Nitrogen fixation in legume and non- legume trees. *Field Crops Research* 65, 183–196.

Staehelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Kondorosi, A. (1995) Lipochitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. *Plant Physiology* 108, 1607–1614.

Staehelin, C., Schultze, M., Tokuyasu, K., Poinot, V., Promé, J.C., Kondorosi, E., Kondorosi, A. (2000) N-deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 72–79.

Staufenberger, T., Imhoff, J.F., Labes, A. (2012) First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. *Microbiological Research* 167, 262–269.

Stintzi, A., Geoffroy, D., Bersuder, D., Fritig, B., Legrand, M. (1993) cDNA cloning and expression studies of tobacco class III chitinases-lysozymes. In: Fritig B, Legrand M (eds), *Developments in Plant Pathology*, vol. 2: Mechanisms of Plant Defense Responses. Proceedings of the 2nd EFPP Conference (Strasbourg, France, August 1992), pp. 312–315. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London

Suarez, V., Staehelin, C., Arango, R., Holtorf, H., Hofsteenge, J., Meins, F. Jr (2001) Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Molecular Biology* 45, 609–618.

Svistoonoff, S., Sy, M.O., Diagne, N., Barker, D.G., Bogusz, D., Franche, C. (2010) Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* *Enod11* early nodulin gene promoter during actinorhizal root nodulation. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 23, 740–747.

Synstad, B., Gåseidnes, S., Van Aalten, D.M., Vriend, G., Nielsen, J.E., Eijsink, V.G. (2004) Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry* 271, 253–262.

Tavares, F., Santos, C.L., Sellstedt, A. (2007) Reactive oxygen species in legume and actinorhizal nitrogen-fixing symbioses: the microsymbiont's responses to an unfriendly reception. *Physiologia Plantarum* 130, 344–356.

Terwisscha van Scheltinga, A.C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., Dijkstra, B.W. (1995) Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase/Lysozyme and X-ray Structure of a Complex with Allosamidin: Evidence for Substrate Assisted Catalysis. *Biochemistry* 34, 15619–15623.

Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kalk, K.H., Beintema, J.J., Dijkstra, B.W. (1994) Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* 2, 1181–1189.

Theis, T., Stahl, U., (2004) Antifungal protein: target, mechanism and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61,437–455.

Thom, R., Cummins, I., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Lapthorn, A.J. (2002) Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry* 41, 7008–7020.

Tisa, L.S., Beauchemin, N., Gtari, M., Sen, A., Wall, L.G. (2013) What stories the *Frankia* genomes start to tell us? *Journal of Biosciences* 38, 719–726

Tisa, L.S., Ensign, J.C. (1987) Isolation and Nitrogenase Activity of Vesicles from *Frankia* sp. strain EAN1pec. *Journal of Bacteriology* 169, 5054-5059.

Tran, D.L., Pham, G.D., Nguyen, X.P., Vu, D.H., Nguyen, N.T., Tran, V.H., Mai, T.T.T., Nguyen, H.B., Le, Q.D., Nguyen, T.N., Ba, T.C. (2011) Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterials *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* Volume 2 number 4.

Tromas, A., Parizot, B., Diagne, N., Champion, A., Hocher, V., et al. (2012) Heart of Endosymbioses: Transcriptomics Reveals a Conserved Genetic Program among Arbuscular Mycorrhizal, Actinorrhizal and Legume-Rhizobial Symbioses. *PLoS ONE* 7(9): e44742.

Tronsmo, A., Harman, G.E. (1993) Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* 208, 74-79

Trudel, J., Aidy, P., Asselin, A. (1989) Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthine tobacco, healthy and infected with tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 315-324

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Sørli, M., Eijsink, V.G.H. (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant Polysaccharides. *FEBS Journal* 280, 3028-3049

van Aalten, D.M., Amadei, A., Linssen, A.B., Eijsink, V.G., Vriend, G., Berendsen, H.J. (1995) The essential dynamics of thermolysin: confirmation of the hinge-bending motion and comparison of simulations in vacuum and water. *Proteins* 22, 45-54.

van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M.G., Eijsink, V.G. (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8979-84.

Van Loon, L.C. (1999) Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In : Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related Proteins in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-19.

Vasse, J., de Billy, F., Truchet, G. (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interactions is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal* 4, 555-566.

Vogelsang, R., Barz, W. (1993) Purification, characterization and differential hormonal regulation of a beta-1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* 189(1), 60-69.

Waffenschmidt, S., Jaenicke, L. (1987) Assay of reducing sugars in the nanomole range with

2,2'-bicinchoninate. *Analytical Biochemistry* 165, 337–340.

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49, 515–532.

Wall, L. (2000) The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 167–182.

Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii T, Sakai H, Uchida M, Tanaka H (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 268, 18567–18572.

Westhoff, P. (2009) The economics of biological nitrogen fixation in the global economy. In: Emerich DW, Krishnan HB. eds. Nitrogen fixation in crop production. Agronomy Monograph No. 52. Madison, WI: American Society of Agronomy, 309–328.

Wilce, M.C., Parker, M.W. (1994) Structure and Function of Glutathione S- Transferases. *Biochememical and Biophysical Ata* 1205, 1-18.

Wirth, S.J., Wolf, G.A. (1992) Micro-plate colourimetric assay for Endoacting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 511-519.

Wohlkönig, A., Huet, J., Looze, Y., Wintjens, R. (2010) Structural Relationships in the Lysozyme Superfamily: Significant Evidence for Glycoside Hydrolase Signature Motifs. *PLoS ONE* 5(11): e15388.

Wongsantichon, J., Kettermann, A. (2005) Alternative splicing of glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 401, 100-116.

Xiao, G., Liu, S., Ji, X., Johnson, W.W., Chen, J., Parsons, J.F., Stevens, W.J., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N. (1996) First sphere and second sphere electrostatic effects in the active site of a class mu glutathione transferase. *Biochemistry* 35, 4753-4765.

Ye, X., Ng, T.B., (2005) A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expression and Purification* 40, 230–236.

Yeh, S., Moffatt, B.A., Griffith, M., Xiong, F., Yang, D.S.C., Wiseman, S.B., Sarhan, F., Danyluk, J., Xue, Y.Q., Hew, C.L., et al. (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology* 124, 1251–1263.

Yu, X.M., Griffith, M. (2001) Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 112, 78–86.

Zakariassen, H., Aam, B.B., Horn, S.J., Vårum, K.M., Sørli, M., Eijsink, V.G. (2009) Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *Journal of Biological Chemistry* 284, 10610-7.

Zeng, Q., Wang X. (2005) Catalytic properties of glutathione-binding residues in a s class glutathione transferase (PtGSTU1) from *Pinus tabulaeformis*. *FEBS Letters* 579, 2657–2662

Zeng, Q.Y., Lu, H. and Wang, X.R. (2005) Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). *Biochimie* 87, 445–455.

Zhang, Z., Lopez, M.F., Torrey, J.G. (1984) A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant Soil* 78, 79–90

Zhong, C., Mansour, S., H., Nambiar-Veetil, M., Bogusz D., Franche, C. (2013) *Casuarina glauca*: A model tree for basic research in actinorhizal symbiosis. *Journal of Biosciences* 38, 815–823.

Zhong, C., Zhang, I., Chen, Y., Jiang, Q., Chen, Z., Liang, J., Pinyopusarerk, K., Franche, C., Bogusz, D. (2010) *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis* 50, 107–114.

Zhong, C., Zhang, Y. (2003) Introduction, cultivation and management of *casuarinas* in China. *Chinese Forestry Science and Technology* 17, 3–5.

Zhong, R., Kays, S.J., Schroeder, B.P., Ye, Z.H. (2002) Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell* 14, 165–179.

Zikakis, J.P. (1984) Chitin, chitosan, and related enzymes, Academic press, Orlando.

Anexos

Anexo 1

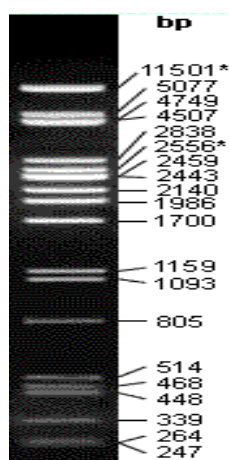
Eletroforese em gel de agarose

A determinação da integridade do DNA genómico e a confirmação da sua concentração e do seu grau de pureza, bem como a visualização dos produtos de PCR e dos plasmídeos recombinantes foram efetuados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (1,2 g agarose/100 ml tampão TAE 1×), contendo este 0,1 µg/ml (Sigma, Espanha) em tampão TAE 1× (40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA).

Às amostras aplicadas em gel foi adicionado tampão de amostra 6× (azul de bromofenol 0,5%, xilenocianol FF 0,25%, sacarose em água 40% (w/v), EDTA 0,5 M a pH 8,0), na proporção de uma parte de tampão para três partes de amostra.

Consoante a resolução desejada, a voltagem aplicada variou entre 80 e 100 volts, durante 40 a 60 minutos. A visualização das bandas foi efetuada com aplicação de luz ultravioleta e o registo efetuado com uma máquina fotográfica sony acoplada ao equipamento Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA).

O padrão utilizado nesta eletroforese foi λ PstI, cujo perfil eletroforético típico se encontra na figura que se segue.



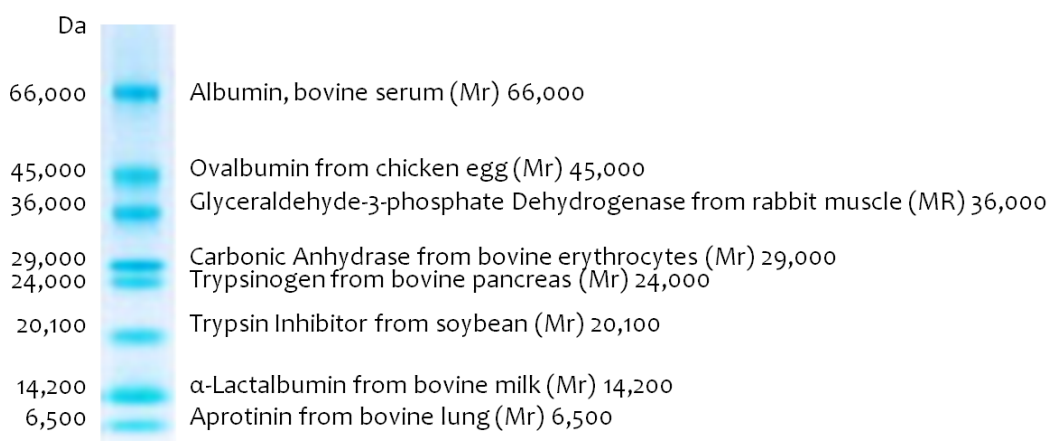
Eletroforese em gel poliacrilamida

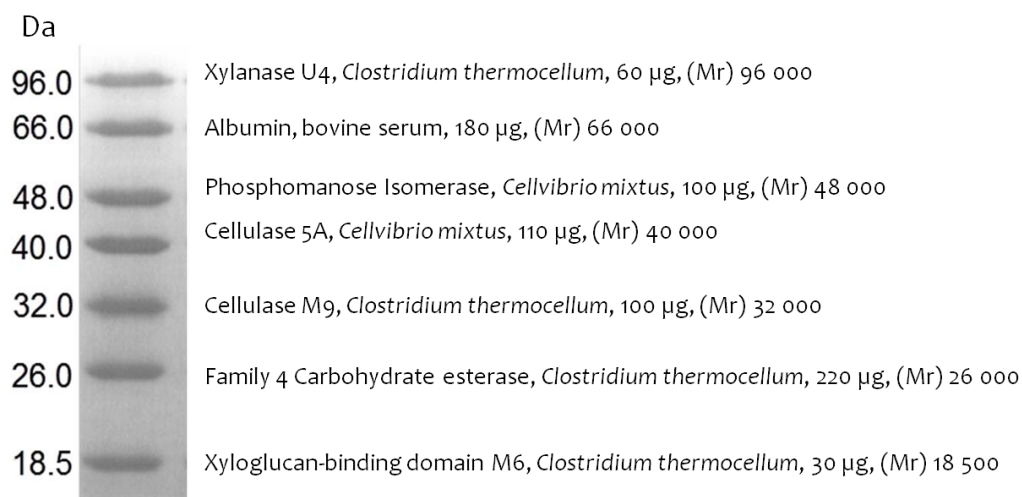
A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi utilizada para observar o conteúdo total proteico celular, assim como para avaliar o grau de pureza das frações proteicas ao longo da purificação. Esta técnica foi realizada como descrita por Laemmli (Laemmli, 1970) e modificada por Hanes & Rickwood (Hanes & Rickwood, 1994).

Os geis de SDS-PAGE foram preparados com 12,5% em acrilamida (p/v), 0,01% SDS, as amostras aplicadas continham uma fração de tampão de amostras – 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 5% (p/v) β -mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol, 0,02% (p/v) azul de bromofenol, de forma a uniformizar a carga de todas as proteínas presentes na amostra. A separação nos geis foi efetuada a voltagem constante de 100 a 120 volts em tampão Tris-glicina-SDS (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 0,1% SDS).

Nestes géis são utilizados agentes que desnaturam as proteínas: SDS, β -mercaptoetanol, sendo as amostras incubadas a 100 °C durante 2 minutos antes de aplicar no gel.

O padrão de pesos moleculares utilizados nesta eletroforese foram os marcadores de baixos pesos moleculares para SDS-PAGE, cujo perfil electroforético típico se encontra na figura que se segue:





As eletroforeses foram realizadas usando tintas Mini-Protean – Mini Gel (Bio-Rad), 7x10 cm, com 0,5 mm de espessura e os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250. O registo dos resultados foi efetuado sobre luz de iluminador de luz branca e fotografados numa máquina fotográfica Kodac Gel Logic 100 equipada com o software *Digital Imaging System*.

Anexo 2

Meio LB/LBagar

Meio Luria e Bertani (LB) para *E.coli*.

bacto-triptona	10 g/l
extrato de levedura	5 g/l
NaCl	10 g/l

Ajustar pH a 7.5 com 5N NaOH. Para meio LB sólido adicionar 15g/l de Bacto-agar.

Stocks glicerol

Os Stocks de glicerol de culturas bacterianas foram realizados com o intuito de manter as bactérias em questão a -80 °C. Estes stocks foram preparados a partir da adição de 150 µL de glicerol a 100% (esterilizado) a 850 µL de cultura bacteriana (percentagem de glicerol máxima de 15%). Os stocks de glicerol foram preparados em condições de assepsia e posteriormente congelados a -80 °C, tendo sido utilizados para realizar novas culturas bacterianas.

Transformação das células competentes de *E. Coli* DH5 α

1. Descongelar as células em gelo (stocks de 100 μ l) e adicionar 10 μ l do produto de ligação.
2. Agitar suavemente e incubar em gelo durante 30 minutos.
3. Incubar a 42°C (num banho) durante 90 segundos.
4. Transferir imediatamente para gelo e incubar durante 2 minutos.
5. Adicionar 750 μ l de meio LB e incubar numa incubadora com agitação orbital a 37°C, 200 rpm durante 60 minutos.
6. Após incubação, centrifugar durante 1 minuto a 13 000 rpm.
7. Retirar cuidadosamente *ca.* de 660 μ l do meio e ressuspender o restante.
8. Plaquear 100 μ l em meio LB sólido contendo 100 μ g/ml ampicilina, e incubar a 37°C durante a noite.

Transformação das células competentes de *E. Coli* BL21

1. Descongelar as células em gelo (stocks de 50 μ l) e adicionar 1 a 5 μ l de pDNA.
2. Agitar suavemente e incubar em gelo durante 30 minutos.
3. Incubar a 42°C (num banho) durante 30 segundos.
4. Transferir imediatamente para gelo e incubar durante 2 minutos.
5. Adicionar 250 μ l de meio LB e incubar numa incubadora com agitação orbital a 37°C, 200 rpm durante 60 minutos.
6. Após incubação, centrifugar durante 1 minuto a 13 000 rpm.
7. Retirar cuidadosamente *ca.* de 200 μ l do meio e ressuspender o restante.
8. Plaquear 100 μ l em meio LB sólido contendo antibiotico, e incubar a 37°C durante a noite.